(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-526554
(P2012-526554A)
(43)公表日　平成24年11月1日(2012.11.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	2G045
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4B024
A61K 38/28	(2006.01)	A61K	37/26		4B063
A61K 31/64	(2006.01)	A61K	31/64		4C084
A61K 31/195	(2006.01)	A61K	31/195		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 181 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-510948 (P2012-510948)
(86)(22)出願日　平成22年5月11日 (2010.5.11)
(85)翻訳文提出日　平成23年12月27日 (2011.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/034420
(87)国際公開番号　WO2010/132479
(87)国際公開日　平成22年11月18日 (2010.11.18)
(31)優先権主張番号　61/177,241
(32)優先日　平成21年5月11日 (2009.5.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/177,243
(32)優先日　平成21年5月11日 (2009.5.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/177,246
(32)優先日　平成21年5月11日 (2009.5.11)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　511181278
バーグ　バイオシステムズ，エルエルシー
アメリカ合衆国　３７２１０　テネシー州，ナッシュビル，エルム　ヒル　パイク　１８４５
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】エピメタボリックシフター、多次元細胞内分子、または環境影響因子を使用する代謝性障害の診断のための方法

(57)【要約】
エピメタボリックシフター、多次元細胞内分子、または環境影響因子を使用する、ヒトにおける代謝性障害を診断するための方法および製剤が記載される。
【選択図】図１

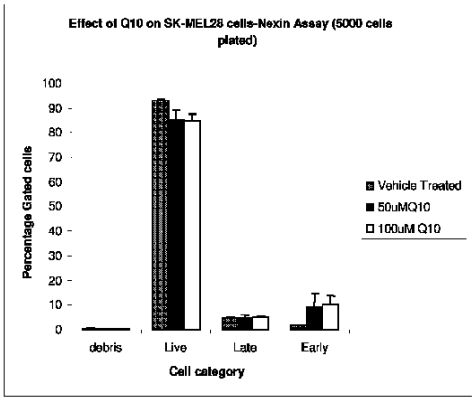


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在する、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを決定すること；ならびに
（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較すること
を含み、
ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、前記被験体が代謝性障害に罹患していることの指標であり、それによって、前記被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する、前記方法。
【請求項２】
被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において調節されること；および
（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較すること
を含み、
ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、前記被験体が代謝性障害に罹患していることの指標であり、それによって、前記被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する、前記方法。
【請求項３】
被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在する、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを決定すること；ならびに
（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較すること
を含み、
ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、被験体が代謝性障害を発症する素因があることの指標であり、それによって、前記被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測する、前記方法。
【請求項４】
被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において調節されること；および
（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較すること
を含み、
ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、被験体が代謝性障害を発症する素因があることの指標であり、それによって、前記被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測す

る、前記方法。
【請求項５】
被験体における代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価する方法であって、
（１）被験体に対する処置レジメンの少なくとも一部を投与する前に被験体から得られた第１の試料に存在するマーカーであって、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを、
（２）処置レジメンの少なくとも一部の投与の後に被験体から得られた第２の試料に存在するマーカーの発現レベル
と比較することを含み、
ここで、第１の試料と比較した場合の第２の試料中のマーカーの発現レベルの調節は、治療が被験体における代謝性障害を処置するために有効であることの指標である、前記方法。
【請求項６】
被験体における代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価する方法であって、
（１）被験体に対する処置レジメンの少なくとも一部を投与する前に被験体から得られた第１の試料に存在するマーカーの発現であって、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において調節されるマーカーの発現のレベルを、
（２）処置レジメンの少なくとも一部の投与の後に被験体から得られた第２の試料に存在するマーカーの発現レベル
と比較することを含み、
ここで、第１の試料と比較した場合の第２の試料中のマーカーの発現レベルの調節は、治療が被験体における代謝性障害を処置するために有効であることの指標である、前記方法。
【請求項７】
代謝性障害をその必要がある被験体において処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、この生物試料は環境影響因子化合物に曝露され、このマーカーは、正の倍率変化および／または負の倍率変化を有する表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択されること；
（２）被験体から得られた第２の生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、この試料は環境影響因子化合物に曝露されていないこと；ならびに
（３）環境影響因子化合物に曝露された生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルと、環境影響因子化合物に曝露されていない生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを比較すること
を含み、
（４）ここで、第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料に存在する負の倍率変化を伴う１つ以上のマーカーの発現レベルの減少は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、そして、
第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料に存在する正の倍率変化を伴う１つ以上のマーカーの発現レベルの増加は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、
それによって、代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する、前記方法。
【請求項８】
代謝性障害をその必要がある被験体において処置するための環境影響因子化合物の有効

性を評価する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、前記生物試料は環境影響因子化合物に曝露され、前記マーカーの発現は細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において上方調節または下方調節されること；
（２）被験体から得られた第２の生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、この試料は環境影響因子化合物に曝露されていないこと；ならびに
（３）環境影響因子化合物に曝露された生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルと、環境影響因子化合物に曝露されていない生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを比較すること
を含み、
（４）ここで、第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料中での１つ以上の下方調節されたマーカーの発現レベルの減少は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、そして、
第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料に存在する１つ以上の上方調節されたマーカーの発現レベルの増加は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、
それによって、代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する、前記方法。
【請求項９】
被験体における代謝性障害を処置するための化合物を同定する方法であって、
（１）被験体から生物試料を入手すること；
（２）その生物試料を試験化合物と接触させること；
（３）被験体から入手された生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーは、正の倍率変化および／または負の倍率変化を伴って、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されること；
（４）生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを、試験化合物と接触されていない対照試料と比較すること；ならびに
（５）生物試料中に存在する負の倍率変化を伴う１つ以上のマーカーの発現レベルを減少する試験化合物、および／または生物試料中に存在する正の倍率変化を伴う１つ以上のマーカーの発現レベルを増加する試験化合物を選択すること
を含み、
それによって、被験体における代謝性障害を処置するための化合物を同定する、前記方法。
【請求項１０】
被験体における代謝性障害を処置するための化合物を同定する方法であって、
（１）被験体から生物試料を入手すること；
（２）その生物試料を試験化合物と接触させること；
（３）被験体から入手された生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において上方調節または下方調節されること；
（４）生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを、試験化合物と接触されていない対照試料と比較すること；ならびに
（５）生物試料中で、１つ以上の下方調節されたマーカーの発現レベルを減少させ、および／または生物試料中で、１つ以上の上方調節されたマーカーの発現レベルを増加させ

る試験化合物を選択すること
を含み、
それによって、被験体における代謝性障害を処置するための化合物を同定する、前記方法。
【請求項１１】
代謝性障害が、糖尿病、肥満、前糖尿病、高血圧、心臓血管疾患、メタボリックシンドローム、および代謝性障害の任意の重要な構成要素からなる群より選択される障害である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
マーカーが、被験体の疾患細胞において、正常化されたミトコンドリアの酸化的リン酸化に向けた細胞の代謝エネルギーシフトを選択的に誘発する、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
試料が被験体から得られる流体を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
流体が血液、嘔吐物、唾液、リンパ液、および尿からなる群より選択される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
試料が血液試料またはその成分である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
試料が被験体から得られた組織またはその成分を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
組織が、骨、結合組織、軟骨、肺、肝臓、腎臓、筋肉組織、心臓、膵臓、および皮膚からなる群より選択される、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
被験体がヒトである、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
生物試料中のマーカーの発現レベルは、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイすることによって決定される、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
転写されたポリヌクレオチドをアッセイすることは、転写されたポリヌクレオチドを増幅することを含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
被験体試料におけるマーカーの発現レベルは、試料中でタンパク質またはその一部をアッセイすることによって決定される、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
マーカーは、マーカーと特異的に結合する試薬を使用してアッセイされる、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
試薬が標識されている、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
試薬が、抗体および抗原結合性抗体フラグメントからなる群より選択される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
試料中のマーカーの発現レベルが、前記試料の、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅反応、逆転写酵素ＰＣＲ分析、一本鎖コンホメーション多型分析（ＳＳＣＰ）、ミスマッチ切断検出、ヘテロ二重鎖分析、サザンブロット分析、ノーザンブロット分析、ウェスタンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション、アレイ分析、デオキシリボ核酸

配列決定、制限断片長多型分析、およびこれらの組み合わせまたは下位組み合わせからなる群より選択される技術を使用して決定される、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２６】

試料中のマーカーの発現レベルが、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ、および質量分析からなる群より選択される技術を使用して決定される、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２７】

マーカーが、ＨＮＦ４アルファ、Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｂｃｌ－ｘＳ、ＢＮＩＰ－２、Ｂｃｌ－２、Ｂｉｒｃ６、Ｂｃｌ－２－Ｌ１１（Ｂｉｍ）、ＸＩＡＰ、ＢＲＡＦ、Ｂａｘ、ｃ－Ｊｕｎ、Ｂｍｆ、ＰＵＭＡ、ｃＭｙｃ、トランスアルドラーゼ１、ＣＯＱ１、ＣＯＱ３、ＣＯＱ６、プレニルトランスフェラーゼ、４－ヒドロベンゾエート、好中球サイトゾル因子２、一酸化窒素シンターゼ２Ａ、スーパーオキシドディスムターゼ２、ＶＤＡＣ、Ｂａｘチャネル、ＡＮＴ、シトクロムｃ、複合体１、複合体ＩＩ、複合体ＩＩＩ、複合体ＩＶ、Ｆｏｘｏ３ａ、ＤＪ－１、ＩＤＨ－１、Ｃｐｔ１Ｃおよびカムキナーゼ ＩＩからなる群より選択されるマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】

マーカーがアポトーシスと関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２９】

マーカーが酸化ストレスと関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３０】

マーカーが熱ショックと関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３１】

マーカーが血管形成と関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３２】

マーカーが糖尿病と関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３３】

マーカーが高血圧と関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３４】

マーカーが心臓血管疾患と関連するマーカーである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３５】

複数のマーカーの発現レベルが決定される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３６】

被験体が、環境影響因子化合物、スルホニルウレア化合物、メグリチニド化合物、プランジン、ナテグリニド化合物、ビグアニド化合物、チアゾリジンジオン化合物、プレコース、シムリン、バイエッタ、ＤＰＰ－ＩＶインヒビター、およびインスリンからなる群より選択される治療で処置される、請求項５～８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３７】

治療が環境影響因子化合物を含む、請求項５または請求項６に記載の方法。

【請求項３８】

治療が、スルホニルウレア化合物を用いる処置、メグリチニド化合物を用いる処置、プランジンを用いる処置、ナテグリニド化合物を用いる処置、ビグアニド化合物を用いる処

置、チアゾリジンジオン化合物を用いる処置、プレコースを用いる処置、シムリンを用いる処置、バイエッタを用いる処置、ＤＰＰ－ＩＶインヒビターを用いる処置、およびインスリンを用いる処置からなる群より選択される処置レジメンをさらに含む、請求項３６または３７に記載の方法。

【請求項３９】

環境影響因子化合物が、多次元細胞内分子（ＭＩＭ）またはエピメタボリックシフター（エピシフター）である、請求項３６または３７に記載の方法。

【請求項４０】

環境影響因子化合物がＣｏＱ１０である、請求項３６または３７に記載の方法。

【請求項４１】

環境影響因子化合物がビタミンＤ３である、請求項３６または３７に記載の方法。

【請求項４２】

環境影響因子化合物が、アセチルＣｏＡ、パルミチル、Ｌ－カルニチン、チロシン、フェニルアラニン、システイン、および小分子からなる群より選択される化合物である、請求項３６または３７に記載の方法。

【請求項４３】

環境影響因子化合物が、フィブロネクチン、ＴＮＦアルファ、ＩＬ－５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、血管形成因子、およびアポトーシス因子からなる群より選択される化合物である、請求項３６または３７に記載の方法。

【請求項４４】

被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価するためのキットであって、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価するためのキットの使用のための説明書を含む、前記キット。

【請求項４５】

被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測するためのキットであって、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測するためのキットの使用のための説明書を含む、前記キット。

【請求項４６】

代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価するためのキットであって、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価するためのキットの使用のための説明書を含む、前記キット。

【請求項４７】

代謝性障害を有する被験体において代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価するためのキットであって、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および代謝性障害を有する被験体において代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価するためのキットの使用のための説明書を含む、前記キット。

【請求項４８】

被験体から生物試料を入手するための手段をさらに含む、請求項４４～４７のいずれか１項に記載のキット。

【請求項４９】

対照試料をさらに含む、請求項４４～４８のいずれか１項に記載のキット。

【請求項５０】

少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための手段が、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイするための手段を含む、請求項４４～４９の

いずれか１項に記載のキット。
【請求項５１】
少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための手段が、試料中のタンパク質またはその一部をアッセイするための手段を含む、請求項４４～４９のいずれか１項に記載のキット。
【請求項５２】
環境影響因子化合物をさらに含む、請求項４４～５１のいずれか１項に記載のキット。
【請求項５３】
複数のマーカーの発現レベルを決定するための試薬を含む、請求項４４～５２のいずれか１項に記載のキット。
【請求項５４】
被験体がＣｏＱ１０反応性状態に罹患しているか否かを評価する方法であって、
（１）被験体から得られた生物試料に存在する、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを決定すること；ならびに
（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較すること
を含み、
ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較された、被験体から入手された生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、被験体がＣｏＱ１０反応性状態に罹患していることの指標であり、それによって、被験体がＣｏＱ１０反応性状態に罹患しているか否かを評価する、前記方法。
【請求項５５】
ＣｏＱ１０反応性状態が代謝性障害である、請求項５４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ Ｕｓｉｎｇ ａｎ Ｅｐｉｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｓｈｉｆｔｅｒ（Ｃｏｅｎｚｙｍｅ Ｑ１０）”という名称の２００９年５月１１日に出願された米国仮出願番号６１／１７７，２４１（代理人整理番号：１１７７３２－００６０１）、“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ Ｕｓｉｎｇ Ｅｐｉｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｓｈｉｆｔｅｒｓ，Ｍｕｌｔｉｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｏｒ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｒｓ”という名称の２００９年５月１１日に出願された米国仮出願番号６１／１７７，２４３（代理人整理番号：１１７７３２－００７０１）、“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ Ｕｓｉｎｇ Ｅｐｉｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｓｈｉｆｔｅｒｓ，Ｍｕｌｔｉｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｏｒ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｒｓ”という名称の２００９年５月１１日に出願された米国仮出願番号６１／１７７，２４４（代理人整理番号：１１７７３２－００８０１）、“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ Ｕｓｉｎｇ Ｅｐｉｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｓｈｉｆｔｅｒｓ，Ｍｕｌｔｉｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｏｒ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｒｓ”という名称の２００９年５月１１日に出願された米国仮出願番号６１／１７７，２４５（代理人整理番号：１１７７３２－００９０１）、および“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ Ｕｓｉｎｇ Ｅｐｉｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｓｈｉｆｔｅｒｓ，Ｍｕｌｔｉｄｉｍｅｎｓｉｏ

ｎａｌ Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｏｒ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｒｓ”という名称の２００９年５月１１日に出願された米国仮出願番号６１／１７７，２４６（代理人整理番号：１１７７３２－０１００１）の優先権を主張する。上述の各出願の内容全体は、参照により本明細書に組み入れられている。

【０００２】

本発明は、糖尿病および肥満などの代謝性障害の診断に関する。

【背景技術】

【０００３】

食事後に血糖のレベルが上昇するにつれて、インスリンが分泌され、エネルギー源として血液からグルコースを活動的に取り込むために末梢組織（骨格筋および脂肪）の細胞を刺激する。調節異常となったインスリンの分泌および作用の結果としてのグルコース恒常性の損失は、典型的には、糖尿病などの代謝性障害を生じ、これは、肥満によって同時に誘発されるか、または肥満によってさらに悪化される可能性がある。これらの状態はしばしば致死的であるので、血流からの適切なグルコースクリアランスを回復させるためのストラテジーが必要とされている。

【０００４】

糖尿病は膵臓に対する広範な損傷を引き起こすいかなる状態（例えば、膵炎、腫瘍、コルチコステロイドまたはペンタミジンなどの特定の薬物の投与、鉄過剰（例えば、血色素症）、後天性または遺伝性内分泌障害、および外科的切除）に対して二次的に発生する可能性があるが、典型的には、糖尿病の最も一般的な型はインスリンシグナル伝達系の一次的障害から発生する。２つの主要な型の糖尿病、すわわち、１型糖尿病（インスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）としてもまた知られる）および２型糖尿病（インスリン非依存性または非インスリン依存性糖尿病（ＮＩＤＤＭ）としてもまた知られる）が存在しており、これらは、それらの異なる病原メカニズムにも関わらず、共通の長期にわたる合併症を共有している。

【０００５】

一次性糖尿病のすべての症例の約１０％に達する１型糖尿病は、膵臓のインスリン産生β細胞の広範な破壊によって特徴付けられる器官特異的自己免疫疾患である。結果としてのインスリン産生の減少は、不可避的にグルコース代謝の調節不全をもたらす。インスリンの投与は、この状態に罹患している患者に顕著な利益を提供するが、インスリンの短い血清半減期は、正常血糖の維持に対する主要な障害である。代替治療は膵島移植であるが、このストラテジーに付随する成功は限られている。

【０００６】

より大きな割合の集団に影響を与えている２型糖尿病は、インスリンの分泌の調節不全および／またはインスリンへに対する末梢組織の応答の減少、すなわち、インスリン抵抗性によって特徴付けられる。２型糖尿病の病因は不明のままであるが、疫学的研究は、この型の糖尿病は、各々が、それ自体の素因のリスクに寄与し、かつ過剰体重、食事、運動不足、薬物、および過度のアルコール消費を含む環境因子によって改変される複数の遺伝子欠損または多型の集合から生じることを示唆している。種々の治療的処置が２型糖尿病の管理のために利用可能であるが、これらには、種々の衰弱性副作用が付随する。したがって、２型糖尿病であるかまたはそのリスクがあると診断された患者は、しばしば、体重の減少、食事の変更、運動、および適度なアルコール摂取を含む、より健康的なライフスタイルを採るようにアドバイスされる。しかし、このようなライフスタイルの変化は、糖尿病によって引き起こされた血管および器官の損傷を逆転させるには十分ではない。

【０００７】

本明細書でＣｏＱ１０、Ｑ１０、ユビキノン、またはユビデカレノンとも呼ばれるコエンザイムＱ１０は、普及している栄養補助食品であり、ＣｏＱ１０の還元型であるユビキノールの抗酸化特性を通じて免疫系の保護を助けるビタミン様栄養補助食品として、カプセル剤形で栄養食品店、健康食品店、薬局などにて見出すことができる。ＣｏＱ１０は、

当分野で認識されており、その全体の開示が参照により本明細書に組み入れられている、国際公開番号ＷＯ２００５／０６９９１６にさらに記載されている。

【０００８】

ＣｏＱ１０は、人体の大半の組織および他の哺乳動物の組織のいたるところで見出される。ヒトにおけるＣｏＱ１０の組織分布および酸化還元状態は、Ｂｈａｇａｖａｎ ａｎｄ Ｃｈｏｐｒａ（２００６ Ｆｒｅｅ Ｒａｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４０（５）：４４５～４５３）による総論において概説されている。著者らは、「一般原則として、心臓、腎臓、肝臓および筋肉などのエネルギー要求または代謝活性の高い組織は、比較的高濃度のＣｏＱ１０を含有する」ことを報告している。著者らはさらに「脳および肺を除く組織中のＣｏＱ１０の大部分はヒドロキノンまたはユビキノール（ｕｎｉｑｕｉｎｏｌ）としての還元型であり、このことはこれらの２つの組織における酸化ストレスの上昇を反映するものと思われる」ことを報告している。特に、Ｂｈａｇａｖａｎは、心臓、腎臓、肝臓、筋肉、腸（ｉｎｔｅｎｓｔｉｎｅ）、および血液（血漿）の中で、それぞれ、約６１％、７５％、９５％、６５％、９５％、および９６％のＣｏＱ１０が還元型で存在することを報告している。同様に、Ｒｕｉｚ－Ｊｉｍｉｎｅｚ ｅｔ ａｌ．（２００７ Ｊ．Ｃｈｒｏｍａ Ａ，１１７５，２４２～２４８）は、ヒト血漿がＱ１０および還元型のＱ１０（Ｑ１０Ｈ２）について評価されたときに、この分子の大部分（９０％）が還元型で見い出されたことを報告している。

【０００９】

ＣｏＱ１０は非常に親油性であり、大部分は水に不溶性である。水中でのその不溶性、脂質中での限られた溶解性、および比較的大きな分子量に起因して、経口投与されたＣｏＱ１０の吸収の効率は乏しい。ＢｈａｇａｖａｎおよびＣｈｏｐｒａは「ラットを用いた１つの研究において、経口投与されたＣｏＱ１０の約２～３％のみが吸収されたことが報告された」と報告している。ＢｈａｇａｖａｎおよびＣｈｏｐｒａは、ラット研究からのデータは、腸における吸収の間またはその後のいずれかに、ＣｏＱ１０はユビキノールに還元されることを示すとさらに報告している。

【００１０】

糖尿病の管理のために現在利用可能であるストラテジーが最適に次ぐものであるならば、より効果的でありかつこのような消耗性副作用と関連しない処置の切実な必要性が存在する。

【発明の概要】

【００１１】

本発明は、少なくとも部分的に、内因性コエンザイムＱ１０（本明細書ではＣｏＱ１０またはＱ１０ともまた呼ばれる）の細胞への適用がアポトーシス能力の回復を生じるという発見に基づいている。アポトーシス性応答は、癌細胞において選択的に誘導される。ミトコンドリアＱ１０レベルの時間および用量応答が観察され、４８時間後に細胞ミトコンドリア中のＱ１０のレベルは６倍上昇した。本発明はさらに、Ｑ１０が、供給された酸化型（酸化促進）に維持され、還元型のＱ１０Ｈ２（抗酸化）にはいかなる有意な量でも転換されないという驚くべきかつ予想されなかった発見に基づいている。本発明は、Ｑ１０で処置された細胞中で有意な数のタンパク質およびｍＲＮＡのレベルが調節されるというさらなる発見に基づいている。これらの調節されたタンパク質は、アポトーシス，癌生物学および細胞増殖、解糖および代謝、分子輸送、ならびに細胞シグナル伝達を含む、複数の細胞経路中に密集することが見出された。

【００１２】

本明細書に記載される出願人らのデータは、Ｑ１０の作用のメカニズムに洞察を与えてきた。特に、理論に拘束されることを望むものではないが、出願人の発見は、Ｑ１０が細胞微小環境に代謝シフトを誘導することを示す。多くの疾患は、代謝状態の変化に関連することが知られている。例えば、示差的代謝が癌細胞において起こることが知られており（Ｗａｒｕｒｇ効果）、それによって、多くの癌細胞が、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（ピルビン酸の酸化）によるのではなく、サイトゾル中での解糖、続いて乳酸発

酵によって優勢にエネルギーを産生する。別の例において、糖尿病および肥満などの代謝性障害は、グルコース代謝の変化と関連する。

【００１３】

したがって、特定の態様において、本発明は、被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から得られた生物試料に存在する、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを決定すること；ならびに（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、被験体が代謝性障害に罹患していることの指標であり、それによって、被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する。

【００１４】

特定の態様において、本発明は、被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において調節されること；および（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、対照試料におけるマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料におけるマーカーの発現レベルの調節は、被験体が代謝性障害に罹患していることの指標であり、それによって、被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価する。

【００１５】

特定の態様において、本発明は、被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測（prognose）する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から得られた生物試料に存在する、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを決定すること；ならびに（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、被験体が代謝性障害を発症する素因があることの指標であり、それによって、その被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測する。

【００１６】

特定の態様において、本発明は、被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において調節されること；および（２）被験体から得られた生物試料に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、対照試料におけるマーカーの発現レベルと比較した、被験体から得られた生物試料におけるマーカーの発現レベルの調節は、被験体が代謝性障害を発症する素因があることの指標であり、それによって、被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測する。

【００１７】

特定の態様において、本発明は、被験体における代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価するための方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体に対する処置レジメンの少なくとも一部を投与する前に、被験体から得られた第１の試料に存在するマーカーであって、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択されるマーカーの発現レベルを、（２）処置レジメンの少なくとも一部の投

与の後に被験体から得られた第２の試料に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、第１の試料と比較した場合の第２の試料中のマーカーの発現レベルの調節は、治療が被験体における代謝性障害を処置するために有効であることの指標である。

【００１８】

特定の態様において、本発明は、被験体における代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価するための方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体に対する処置レジメンの少なくとも一部を投与する前に、被験体から得られた第１の試料に存在するマーカーの発現であって、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において調節されるマーカーの発現のレベルを、（２）処置レジメンの少なくとも一部の投与の後に被験体から得られた第２の試料に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、第１の試料と比較した場合の第２の試料中のマーカーの発現レベルの調節は、治療が被験体における代謝性障害を処置するために有効であることの指標である。

【００１９】

特定の態様において、本発明は、代謝性障害をその必要がある被験体において処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から得られた生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、この生物試料は環境影響因子化合物に曝露され、このマーカーは、正の倍率変化および／または負の倍率変化を有する表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択されること；（２）被験体から得られた第２の生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、この試料は環境影響因子化合物に曝露されていないこと；ならびに（３）環境影響因子化合物に曝露された生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルと、環境影響因子化合物に曝露されていない生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを比較することを含み、ここで、第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料に存在する負の倍率変化を伴う１つ以上のマーカーの発現レベルの減少は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、そして、第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料に存在する正の倍率変化を伴う１つ以上のマーカーの発現レベルの増加は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、それによって、代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する。

【００２０】

特定の態様において、本発明は、代謝性障害をその必要がある被験体において処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から得られた生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、この生物試料は環境影響因子化合物に曝露され、このマーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において上方調節または下方調節されること；（２）、被験体から得られた第２の生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、試料は環境影響因子化合物に曝露されていないこと；および（３）環境影響因子化合物に曝露された生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルと、環境影響因子化合物に曝露されていない生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを比較することを含み、ここで、第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料中での１つ以上の下方調節されたマーカーの発現レベルの減少は、環境影響因子化合物が、代謝性障害を処置するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、そして、第２の試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルと比較して、環境影響因子化合物に曝露された生物試料に存在する１つ以上の上方調節されたマーカーの発現レベルの増加は、環境影響因

子化合物が、代謝性障害を治療するためにそれが必要な被験体において有効であることの指標であり、それによって、代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価する。

【００２１】

特定の態様において、本発明は、被験体における代謝性障害を処置するために、化合物を同定する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から生物試料を入手すること；（２）その生物試料を試験化合物と接触させること；（３）被験体から入手された生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーは、正の倍率変化および／または負の倍率変化を伴って、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されたマーカーからなる群より選択されること；（４）生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを、試験化合物と接触されていない対照試料と比較すること；ならびに（５）生物試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを負の倍率変化を伴って減少する試験化合物、および／または生物試料中に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを正の倍率変化を伴って増加する試験化合物を選択することを含み、それによって、被験体における代謝性障害を処置するための化合物を同定する。

【００２２】

特定の態様において、本発明は、被験体における代謝性障害を処置するために、化合物を同定する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から生物試料を入手すること；（２）その生物試料を試験化合物と接触させること；（３）被験体から入手された生物試料に存在する１つ以上のマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーの発現は、細胞代謝エネルギーシフトが正常なミトコンドリアの酸化的リン酸化に向かうように誘導された代謝性障害の疾患細胞において上方調節または下方調節されること；（４）生物試料中の１つ以上のマーカーの発現レベルを、試験化合物と接触されていない対照試料と比較すること；ならびに（５）生物試料中で、１つ以上の下方調節されたマーカーの発現レベルを減少させ、および／または生物試料中で、１つ以上の上方調節されたマーカーの発現レベルを増加させる試験化合物を選択することを含み、それによって、被験体における代謝性障害を処置するための化合物を同定する。

【００２３】

ある実施形態において、代謝性障害は、糖尿病、肥満、前糖尿病、高血圧、心臓血管疾患、メタボリックシンドローム、および代謝性障害の任意の重要な構成要素からなる群より選択される障害である。

【００２４】

ある実施形態において、マーカーは、被験体の疾患細胞において、正常化されたミトコンドリアの酸化的リン酸化に向けた細胞の代謝エネルギーシフトを選択的に誘発する。

【００２５】

ある実施形態において、試料は被験体から得られる流体を含み、例えば、流体は、血液、嘔吐物、唾液、リンパ液、嚢胞液、尿、気管支洗浄により収集された流体、腹腔洗浄により収集された流体、および婦人科学的流体からなる群より選択される。ある実施形態において、試料は血液試料またはその成分である。ある実施形態において、試料は、被験体から得られた組織またはその成分、例えば、骨、結合組織、軟骨、肺、肝臓、腎臓、筋肉組織、心臓、膵臓、および皮膚からなる群より選択される組織である。

【００２６】

ある実施形態において、被験体はヒトである。

【００２７】

ある実施形態において、生物試料中のマーカーの発現レベルは、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイすることによって決定される。ある実施形態において、転写されたポリヌクレオチドをアッセイすることは、転写されたポリヌクレオチドを増幅することを含む。ある実施形態において、被験体試料におけるマーカーの発現レベルは、試料中でタンパク質またはその一部をアッセイすることによって決定される。ある実施形態において、マーカーは、試薬、例えば、マーカーと特異的に結合する標識試薬

を使用してアッセイされる。試薬には、例えば、抗体および抗原結合性抗体フラグメントが含まれてもよい。

【００２８】

ある実施形態において、試料中のマーカーの発現レベルは、試料の、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅反応、逆転写酵素ＰＣＲ分析、一本鎖コンホメーション多型分析（ＳＳＣＰ）、ミスマッチ切断検出、ヘテロ二重鎖分析、サザンブロット分析、ノーザンブロット分析、ウェスタンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション、アレイ分析、デオキシリボ核酸配列決定、制限断片長多型分析、およびこれらの組み合わせまたは下位組み合わせからなる群より技術を使用して決定される。ある実施形態において、試料中のマーカーの発現レベルは、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ、および質量分析からなる群より選択される技術を使用して決定される。

【００２９】

ある実施形態において、マーカーは、ＨＮＦ４アルファ、Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｂｃｌ－ｘＳ、ＢＮＩＰ－２、Ｂｃｌ－２、Ｂｉｒｃ６、Ｂｃｌ－２－Ｌ１１（Ｂｉｍ）、ＸＩＡＰ、ＢＲＡＦ、Ｂａｘ、ｃ－Ｊｕｎ、Ｂｍｆ、ＰＵＭＡ、ｃＭｙｃ、トランスアルドラーゼ１、ＣＯＱ１、ＣＯＱ３、ＣＯＱ６、プレニルトランスフェラーゼ、４－ヒドロベンゾエート、好中球サイトゾル因子２、一酸化窒素シンターゼ２Ａ、スーパーオキシドディスムターゼ２、ＶＤＡＣ、Ｂａｘチャネル、ＡＮＴ、シトクロムｃ、複合体１、複合体ＩＩ、複合体ＩＩＩ、複合体ＩＶ、Ｆｏｘｏ３ａ、ＤＪ－１、ＩＤＨ－１、Ｃｐｔ１Ｃおよびカムキナーゼ ＩＩからなる群より選択されるマーカーである。ある実施形態において、マーカーはアポトーシスと関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは酸化ストレスと関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは熱ショックと関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは血管形成と関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは糖尿病と関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは高血圧と関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは心臓血管疾患と関連するマーカーである。

【００３０】

ある実施形態において、複数のマーカーの発現レベルが決定される。

【００３１】

ある実施形態において、被験体は、環境影響因子化合物、スルホニルウレア化合物、メグリチニド化合物、プランジン、ナテグリニド化合物、ビグアニド化合物、チアゾリジンジオン化合物、プレコース、シムリン、バイエッタ、ＤＰＰ－ＩＶインヒビター、およびインスリンからなる群より選択される療法で治療される。ある実施形態において、治療は、環境影響因子化合物を含む。環境影響因子化合物は、例えば、多次元細胞内分子（ＭＩＭ）またはエピメタボリックシフター（エピシフター）であり得る。ある実施形態において、環境影響因子化合物はＣｏＱ１０である。ある実施形態において、環境影響因子化合物はビタミンＤ３である。ある実施形態において、環境影響因子化合物は、アセチルＣｏＡ、パルミチル、Ｌ－カルニチン、チロシン、フェニルアラニン、システイン、および小分子からなる群より選択される化合物である。ある実施形態において、環境影響因子化合物はフィブロネクチン、ＴＮＦアルファ、ＩＬ－５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、血管形成因子、およびアポトーシス因子からなる群より選択される化合物である。ある実施形態において、治療は、スルホニルウレア化合物を用いる処置、メグリチニド化合物を用いる処置、プランジンを用いる処置、ナテグリニド化合物を用いる処置、ビグアニド化合物を用いる処置、チアゾリジンジオン化合物を用いる処置、プレコースを用いる処置、シムリンを用いる処置、バイエッタを用いる処置、ＤＰＰ－ＩＶインヒビターを用いる処置、およびインスリンを用いる処置からなる群より選択される処置レジメンをさらに含む。

【００３２】

特定の態様において、本発明は、被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価するためのキットに向けられる。このようなキットは、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レ

ベルを決定するための試薬、および被験体が代謝性障害に罹患しているか否かを評価するためのキットの使用のための説明書を含む。

【００３３】

特定の態様において、本発明は、被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測するためのキットに向けられる。このようなキットは、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測するためのキットの使用のための説明書を含む。

【００３４】

特定の態様において、本発明は、代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価するためのキットに向けられる。このようなキットは、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および代謝性障害を処置するための治療の有効性を評価するためのキットの使用のための説明書を含む。

【００３５】

特定の態様において、本発明は、代謝性障害を有する被験体において代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価するためのキットに向けられる。このようなキットは、表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、および代謝性障害を有する被験体において代謝性障害を処置するための環境影響因子化合物の有効性を評価するためのキットの使用のための説明書を含む。

【００３６】

ある実施形態において、このキットは被験体から生物試料を入手するための手段をさらに含む。ある実施形態において、このキットは対照試料をさらに含む。ある実施形態において、環境影響因子化合物をさらに含む。ある実施形態において、このキットは、複数のマーカーの発現レベルを決定するための試薬を含む。

【００３７】

ある実施形態において、少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための手段は、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイするための手段を含む。ある実施形態において、少なくとも１つのマーカーの発現レベルを決定するための手段は、試料中のタンパク質またはその一部をアッセイするための手段を含む。

【００３８】

特定の態様において、本発明は、被験体がＣｏＱ１０反応性状態に罹患しているか否かを評価する方法に向けられる。このような方法は、（１）被験体から入手された生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定することであって、ここで、マーカーが表２～４および６～２９および６４～６９に列挙されるマーカーからなる群より選択されること；ならびに（２）被験体から入手された生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを、対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較することを含み、ここで、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較された、被験体から入手された生物試料中のマーカーの発現レベルの調節は、被験体がＣｏＱ１０反応性状態に罹患していることの指標である、比較することを含み、それによって、被験体がＣｏＱ１０反応性状態に罹患しているか否かを評価する。ある実施形態において、ＣｏＱ１０反応性状態は代謝性障害である。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、２４時間のＱ１０処置に対するＳＫ－ＭＥＬ－２８の感受性。

【図２】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、２４時間のＱ１０処置に対するＳＫＢＲ３の感受性。

【図３】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、２４時間のＱ１０処置に対するＰａＣａ２の感受性。

【図４】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、２４時間のＱ１０処置に対するＰＣ－３の感受性。
【図５】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、２４時間のＱ１０処置に対するＨｅｐＧ２の感受性。
【図６】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、２４時間のＱ１０処置に対するＭＣＦ－７の感受性。
【図７】アポストランドＥＬＩＳＡ法によって測定されたような、Ｑ１０による２４時間処置時のアポトーシス細胞の測定。
【図８】２次元ゲル電気泳動のゲル分析例。同定のために切除されたスポットがマーキングされている。
【図９】ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞中でＱ１０によって調節されているような、２次元ゲル電気泳動によって同定されたタンパク質間の相互作用のネットワーク。
【図１０】Ｔｈｅ ｐｅｎｔｏｓｅ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｐａｔｈｗａｙ ａｄａｐｔｅｄ ｆｒｏｍ Ｖｅｒｈｏｅｖｅｎ ｅｔ ａｌ．（Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．２００１ ６８（５）：１０８６－１０９２）．
【図１１】ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞のミトコンドリア高濃度物質の２次元ゲル。切除され、質量分析キャラクタリゼーションによって同定されたスポットがマーキングされている。
【図１２】培養培地中への１００μＭ Ｑ１０の外部からの添加後の、ＳＫ－ＭＥＬ－２８ミトコンドリアに存在するＱ１０の相対量の比較プロット。
【図１３Ａ】公知のプロセスのアポトーシス経路マッピング。
【図１３Ｂ】公知のプロセスのアポトーシス経路マッピング。
【図１４】Ｂｃｌ－ｘｌのウェスタンブロット分析。
【図１５】ビメンチン抗体によって証明されたＳＫ－ＭＥＬ－２８試料セットのウェスタンブロット分析。
【図１６】酸化的リン酸化複合体（ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ番号ＭＳ６０１）をターゲティングする５種類の抗体によって評価されたいくつかの株化細胞からの細胞溶解のウェスタンブロット分析。
【図１７】Ｆ１－アルファレベルのウェスタンブロット比較。
【図１８】Ｃ－ＩＩＩ－Ｃｏｒｅ２とのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図１９】Ｃ－ＩＩ－３０とのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２０】Ｃ－ＩＶ－ＣＯＸＩＩとのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２１】Ｃ－Ｉ－２０（ＮＤ６）とのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２２】５種類のミトコンドリアタンパク質に対する多種多様の細胞タイプのウェスタンブロット分析。
【図２３】複合体Ｖタンパク質Ｃ－Ｖ－αとのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２４】Ｃ－ＩＩＩ－Ｃｏｒｅ１とのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２５】ポリン（ＶＤＡＣ１）とのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２６】シクロフィリンＤとのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２７】シトクロムＣとのＱ１０応答のウェスタンブロット比較。
【図２８】Ｈｅｌｉｘ １０オープン立体配座のＨＮＦ４アルファ（１Ｍ７Ｗ．ｐｄｂ）の脂質結合チャネルに挿入されたＱ１０（球）の理論モデル。
【図２９】正常酸素条件および低酸素条件での各種のグルコース条件におけるＨＤＦａ細胞のＯＣＲ。
【図３０】正常酸素条件および低酸素条件での各種のグルコース条件におけるＨＡＳＭＣ細胞のＯＣＲ。
【図３１】ＣｏＱ１０とストレス因子の存在下および非存在下での、ＭＣＦ－７乳癌細胞中のＯＣＲ値。
【図３２】ＣｏＱ１０とストレス因子の存在下および非存在下での、ＰａＣａ－２膵臓癌細胞中のＯＣＲ値。

【発明を実施するための形態】
【００４０】
定義
本明細書で使用する場合、以下の用語のそれぞれが、本セクションおける用語と関連する意味を有する。
【００４１】
冠詞「ａ」および「ａｎ」は、冠詞の文法的対象のうち１つまたは１つを超える（すなわち少なくとも１つ）を指すために本明細書で使用される。１例として、「要素」は、１つの要素または１つを超える要素を意味する。
【００４２】
「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語は、「限定されるわけではないが、含む」という句を意味するために本明細書で使用され、「限定されるわけではないが、含む」と互換的に使用される。
【００４３】
「または」という用語は、状況が別途明らかに指摘しない限り、「および／または」という用語を意味するために本明細書で使用され、「および／または」という用語と互換的に使用される。
【００４４】
「などの」という用語は、「限定されるわけではないが、などの」という句を意味するために本明細書で使用され、「限定されるわけではないが、などの」と互換的に使用される。
【００４５】
本発明の方法によって処置される「患者」または「被験体」は、ヒトまたは非ヒト動物のどちらか、好ましくは哺乳動物を意味することができる。本明細書で使用される場合、「被験体」または「患者」は、非限定的に、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ハムスター、サル、モルモット、ラット、マウス、トカゲ、ヘビ、ヒツジ、ウシ、魚類、および鳥類を含む任意の動物（例えば、ヒト）を含む。
【００４６】
本明細書で使用される場合、「生存」とは、代謝性障害のために処置された被験体の生命の継続をいう。１つの実施形態において、生存とは、代謝性障害の再発がないことををいう。
【００４７】
「予防すること」または「予防」は、疾患または障害を獲得するリスクの低減（すなわち疾患の臨床症候の少なくとも１つを、疾患に曝露され得るまたは疾患の素因があり得るが、疾患の症候をまだ経験または提示していない患者において発症させないようにすること）を指す。
【００４８】
本明細書で使用される場合、「量」という用語は、（ａ）分子中で測定されるような絶対量、モル、または単位体積もしくは細胞あたりの重量、あるいは（ｂ）例えば、０～５までの数字による順位づけによって指定されるような相対量のいずれかをいう。
【００４９】
本明細書で使用される場合、「対照量」という用語は、代謝性障害に罹患していない被験体に由来する細胞または試料中のマーカーの量をいう。「対照量」は、例えば、マーカーを発現する、例えば、高レベルで、中程度のレベルで、および低レベルでこれらのタンパク質を発現することが知られている細胞または組織に存在するマーカーの平均量を計算することによって決定されてもよい。
【００５０】
「治療的有効量」は、患を処置するために患者に投与されたときに疾患に対してこのような処置をもたらすのに十分である化合物の量を意味する。疾患を予防するために投与されたときに、量は、疾患の開始を回避または遅延するのに十分である。「治療的有効量」

は、化合物、疾患およびその重症度ならびに処置される患者の年齢、体重などに応じて変動するであろう。

【００５１】

「予防すること」または「予防」は、疾患または障害を獲得するリスクの低減（すなわち疾患の臨床症候の少なくとも１つを、疾患に曝露され得るまたは疾患の素因があり得るが、疾患の症候をまだ経験または提示していない患者において発症させないようにすること）を指す。

【００５２】

「予防」または「治療」処置という用語は、対象組成物の１つ以上の被験体への投与を指す。望ましくない症状（例えば宿主動物の疾患または他の望ましくない状態）の臨床顕在化の前に投与される場合、ここで処置は予防的であり、すなわち処置は宿主が望ましくない症状を発症することから保護するのに対して、望ましくない症状の顕在化後に投与される場合、処置は治療である（すなわち既存の望ましくない症状またはそれからの副作用を減少、緩和または維持するものとする）。

【００５３】

「治療効果」という用語は、動物、特に哺乳動物、およびさらに詳細にはヒトにおいて薬理学的活性物質によって引き起こされる、局所または全身効果を指す。該用語はそれゆえ、動物またはヒトにおける疾患の診断、治癒、軽減、処置もしくは予防でのまたは所望の身体的もしくは精神的発達および状態の増強での使用が意図されるいずれの物質も意味する。「治療的有効量」という句は、いずれの処置にも適用できる合理的な利益／リスク比にてある望ましい局所または全身効果を産生するような物質の量を意味する。ある実施形態において、化合物の治療的有効量は、その治療指数、溶解性などに依存するであろう。例えば、本発明の方法によって見出されたある化合物は、このような処置に適用できる合理的な利益／リスク比を産生するために十分な量で投与され得る。

【００５４】

「発現」という用語は、ポリペプチドがＤＮＡから産生されるプロセスを意味するために本明細書で使用される。プロセスは、遺伝子のｍＲＮＡへの転写およびこのｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳を包含する。使用される状況に応じて、「発現」は、ＲＮＡ、タンパク質またはその両方の産生を指す。

【００５５】

「細胞中での遺伝子の発現レベル」または「遺伝子発現レベル」という用語は、細胞中の遺伝子によってコードされる、ｍＲＮＡ、ならびにプレｍＲＮＡ新生転写物、転写プロセシング中間体、成熟ｍＲＮＡ、および分解生成物のレベルをいう。

【００５６】

「調節」という用語は、応答の上方調節（すなわち活性化または刺激）、下方調節（すなわち阻害または抑制）、または組合されたもしくは別々のその２つを指す。「モジュレーター」は、調節する化合物または分子であり、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、アクチベーター、刺激物質、サプレッサー、または阻害剤であり得る。

【００５７】

「より高レベルの発現」、「より高レベルの活性」、「発現レベルの増加」、または「活性レベルの増加」とは、発現および／または活性を評価するために利用されるアッセイの標準誤差よりも大きく、かつ好ましくは、対照試料（例えば、発癌性障害に罹患していない健常被験体からの試料）におけるマーカーの発現レベルおよび／または活性、好ましくは、いくつかの対照試料におけるマーカーの平均発現レベルおよび／または活性の少なくとも２倍、より好ましくは３倍、４倍、５倍、または１０倍以上である、試験試料中の発現レベルおよび／または活性をいう。

【００５８】

「より低レベルの発現」、「より低レベルの活性」、「発現レベルの減少」、または「活性レベルの減少」とは、発現および／または活性を評価するために利用されるアッセイの標準誤差よりも大きいが、しかし好ましくは、対照試料（例えば、マーカーの予測能力

のための妥当性標準として働くフォローアップ情報を有する腫瘍学的障害のパネルに対して直接的または間接的に較正されている試料）におけるマーカーの発現レベルおよび／または活性、好ましくは、いくつかの対照試料におけるマーカーの平均発現レベルおよび／または活性の少なくとも１／２倍、より好ましくは１／３倍、１／４倍、１／５倍、または１／１０倍である、試験試料中の発現レベルおよび／または活性をいう。

【００５９】

本明細書で使用される場合、「抗体」には、例として、天然に存在する型の抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ）および単鎖抗体、キメラおよびヒト化抗体、多価抗体、ならびに前述のすべてのフラグメントおよび誘導体などの組換え抗体が含まれ、このフラグメントおよび誘導体は少なくとも１つの抗原結合部位を有する。抗体誘導体は、抗体に結合体化されたタンパク質または化学部分を含んでもよい。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「既知の標準」または「対照」とは、本発明のマーカー、および代謝性障害の存在または非存在に関して適用可能であるような、１つ以上の量および／または数学的な関係をいう。既知の標準を生成するための試薬には、非限定的に、代謝性障害を有さない患者からの細胞、および任意に標識された抗体が含まれる。既知の標準はまた、特定のマーカータンパク質を発現するように、もしくは特定のマーカータンパク質を発現しないように操作された細胞系統を含むがこれに限定されない組織培養細胞系統、または一定量のマーカータンパク質を構成的に含むか、もしくはマーカータンパク質を発現するように操作されることもできる（例えば、環境の変化への曝露によって、ここで、このような環境の変化には、増殖因子、ホルモン、ステロイド、サイトカイン、抗体、種々の薬物および代謝拮抗物質、ならびに細胞外マトリックスが含まれてもよいがこれらに限定されない）かのいずれかである試料を含んでもよい。細胞系統は、分析のためにガラススライド上に直接的に装着され、固定され、ペレットとして直接的にパラフィンに包埋され、またはアガロースなどのマトリックスに懸濁され、次いで固定され、パラフィンに包埋され、切片化され、そして組織試料として処理されてもよい。標準は、マーカータンパク質の予測能力のための妥当性標準として働くフォローアップ情報を有する患者試料のパネルに対して直接的または間接的に較正されなければならない。

【００６１】

本明細書で使用される場合、「初期の処置」とは、代謝性障害に罹患している被験体の最初の処置をいう。初期の処置には、非限定的に、スルホニルウレア化合物、メグリチニド化合物、プランジン、ナテグリニド化合物、ビグアニド化合物、チアゾリジンジオン化合物、プレコース、シムリン、バイエッタ、ＤＰＰ－ＩＶインヒビター、またはインスリンを用いる処置が含まれる。

【００６２】

代謝性障害の少なくとも１つの徴候が軽減され、終了され、遅延され、もしくは予防されることが予測され、または軽減され、終了され、減速され、もしくは予防されている場合、代謝性障害は「処置される」。本明細書で使用される場合、代謝性障害の再発または進行が低減され、遅延され、減速され、または予防される場合、代謝性障害はまた「処置される」。

【００６３】

キットは、本明細書のマーカーを特異的に検出するための少なくとも１種の試薬、例えば、プローブ、を含む任意の製造物（例えば、パッケージまたは容器）であり、この製造物は、本発明の方法を実施するための単位として、販売促進され、分配され、または販売される。

【００６４】

「代謝経路」は、１つの化合物を別の化合物に変換して、中間体および細胞機能のためのエネルギーを提供する、一連の酵素媒介反応を指す。代謝経路は線形または環式であることができる。

【００６５】

「代謝状態」は、各種の化学的および生物学的指標が健康または疾患の状態に関連するため、各種の化学的および生物学的指標によって測定されるような所与の時点における特定の細胞、多細胞または組織環境の分子内容物を指す。

【００６６】

「マイクロアレイ」という用語は、基質、例えば紙、ナイロンもしくは他の種類の膜、フィルタ、チップ、ガラススライド、またはその他の好適な固体支持体上で合成された別個のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド（例えば抗体）またはペプチドのアレイを指す。

【００６７】

「障害」および「疾患」という用語は、包括的に使用され、体のいずれの部分、器官または系（またはそのいずれの組み合わせ）の正常な構造または機能からのいずれの逸脱も指す。特異的疾患は、生物学的、化学的および物理的変化を含む特徴的症候および徴候によって明らかとなり、限定されるわけではないが、人口統計学的因子、環境因子、雇用因子、遺伝的因子および病歴因子を含む、多種多様の他の因子と関連することが多い。ある特徴的な徴候、症候、および関連因子は、重要な診断情報を産する多種多様の方法によって定量化することができる。

【００６８】

ある実施形態において、本発明は、コエンザイムＱ１０反応性状態を、その診断または予後診断する必要がある被験体において、診断または予後診断するための方法を提供する。言語「コエンザイムＱ１０反応性状態」または「ＣｏＱ１０反応性状態」には、コエンザイムＱ１０の投与により処置する、予防する、または別の意味で緩和することができる疾患、障害、状態、および／または症状が含まれる。いずれかの特定の理論によって拘束されることを望むものではなく、本明細書でさらに記載されるように、細胞微小環境への代謝シフト、例えば正常状態細胞における酸化的リン酸化の種類および／またはレベルに向けたシフトを誘導することによって、少なくとも部分的に機能することが考えられる。したがって、いくつかの実施形態において、ＣｏＱ１０反応性状態は、細胞微小環境の代謝の改変から生じる状態である。コエンザイムＱ１０反応性状態は、例えば解糖および乳酸塩生合成に向かって偏り得る、例えば腫瘍性障害を含む。いくつかの実施形態において、ＣｏＱ１０反応性腫瘍性障害は数ある中でも、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、または骨癌、扁平上皮細胞癌腫、基底細胞癌腫、黒色腫、および光線性角化症を含む。コエンザイムＱ１０反応性状態は、例えば肥満、糖尿病、糖尿病前症、メタボリックシンドローム、満腹、および内分泌異常などの代謝性障害も含む。コエンザイムＱ１０反応性状態は、本明細書に記載するような他の代謝性障害をさらに含む。

【００６９】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物、例えば本明細書に記載するＭＩＭまたはエピシフターは、コエンザイムＱ１０と共通の活性を共有する。本明細書で使用する場合、「コエンザイムＱ１０と共通の活性を共有する」という句は、化合物がコエンザイムＱ１０と同じまたは類似の活性の少なくとも一部を呈する能力を指す。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムＱ１０の活性の２５％またはそれ以上を呈する。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムＱ１０の活性の最大約１３０％（１３０％を含む）を呈する。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムＱ１０の活性の約３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、１０１％、１０２％、１０３％、１０４％、１０５％、１０６％、１０７％、１０８％、１０９％、１１０％、１１１％、１１２

％、１１３％、１１４％、１１５％、１１６％、１１７％、１１８％、１１９％、１２０％、１２１％、１２２％、１２３％、１２４％、１２５％、１２６％、１２７％、１２８％、１２９％、または１３０％を呈する。本段落に挙げられた各値が「約」という用語によって修飾され得ることが理解される。加えて、本段落に挙げられたいずれの２つの値によって定義されたいずれの範囲も、本発明に含まれることを意味することが理解される。例えばいくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムＱ１０の活性の約５０％～約１００％を呈する。いくつかの実施形態において、コエンザイムＱ１０および本発明の化合物によって共有される活性は、細胞代謝におけるシフトを誘導する能力である。ある実施形態において、ＣｏＱ１０および本発明の化合物はによって共有される活性は、ＯＣＲ（酸素消費速度）および／またはＥＣＡＲ（細胞外酸性化速度）によって測定される。

【００７０】

キットは、本明細書のマーカーを特異的に検出するための少なくとも１種の試薬、例えば、プローブ、を含む任意の製造物（例えば、パッケージまたは容器）であり、この製造物は、本発明の方法を実施するための単位として、販売促進され、分配され、または販売される。

【００７１】

「コエンザイム生合成経路の中間体」という用語は、本明細書で使用する場合、チロシンおよびアセチル－ＣｏＡのユビキノン（ｕｑｉｑｕｉｎｏｎｅ）への化学的／生物学的変換の間に形成される化合物を特徴付ける。コエンザイム生合成経路の中間体は、３－ヘキサプレニル－４－ヒドロキシベンゾエート、３－ヘキサプレニル－４，５－ジヒドロキシベンゾエート、３－ヘキサプレニル－４－ヒドロキシ－５－メトキシベンゾエート、２－ヘキサプレニル－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－ヘキサプレニル－３－メチル－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－ヘキサプレニル－３－メチル－５－ヒドロキシ－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、３－オクタプレニル－４－ヒドロキシベンゾエート，２－オクタプレニルフェノール、２－オクタプレニル－６－メチルオキシ（ｍｅｔｈｏｌｘｙ）フェノール，２－オクタプレニル－３－メチル－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－オクタプレニル－３－メチル－５－ヒドロキシ－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－デカプレニル－３－メチル－５－ヒドロキシ－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－デカプレニル－３－メチル－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－デカプレニル－６－メトキシ－１，４－ベンゾキノン、２－デカプレニル－６－メトキシフェノール、３－デカプレニル－４－ヒドロキシ－５－メトキシベンゾエート、３－デカプレニル－４，５－ジヒドロキシベンゾエート、３－デカプレニル－４－ヒドロキシベンゾエート、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、４－ヒドロキシフェニル乳酸、４－ヒドロキシ－ベンゾエート、４－ヒドロキシ桂皮酸およびヘキサプレニル（ｈｅｘａｐｒｅｎｙ）２リン酸を含む。

【００７２】

本明細書中で使用される場合は、表現「グルコースの嫌気的使用」または「嫌気的解糖」は、解糖、それに続くサイトゾル中での乳酸発酵による細胞のエネルギー産生をいう。例えば多くの癌細胞は、嫌気的解糖によってエネルギーを産生する。

【００７３】

本明細書で使用する場合、「好気的解糖」または「ミトコンドリア酸化的リン酸化」は、ミトコンドリアでの解糖によるエネルギーの細胞産生とそれに続くピルビン酸の酸化を指す。

【００７４】

本明細書中で使用される場合は、表現「グルコースの嫌気的使用を遮断し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を促進することができる」は、嫌気的解糖から好気的解糖へまたはミトコンドリアの酸化的リン酸化への細胞の代謝状態のシフトあるいは変化を誘導する環境影響因子（例えば、ｅｐｉｔｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ｓｈｉｆｔｅｒ）の能力をいう。

【００７５】

Ｉ．代謝性障害

本発明は、代謝性障害を診断および予後診断するための方法を提供する。本明細書で使用される場合、「代謝性障害」は、患者の代謝の変化から生じる任意の病理学的状態をいう。このような障害には、異常な全身グルコース、脂質および／またはタンパク質の代謝、ならびにそこから発生する病理学的な結果に関連するものが含まれる。代謝性障害には、例えば、高血糖を生じる、グルコース恒常性の変化から生じるものが含まれる。本発明に従うと、グルコースレベルの変化は、典型的には、健常個体におけるこのようなレベルと比較して、少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％さえのグルコースレベルの増加である。代謝性障害は細胞増殖、成長、分化、または移動、恒常性の細胞調節、細胞内もしくは細胞間の連絡；組織機能、例えば、肝臓機能、筋肉機能、または脂肪細胞機能；生物における全身性応答、例えば、ホルモン応答（例えば、インスリン応答）などの細胞機能に有害な影響を与え得る。代謝性障害には、肥満、糖尿病（本明細書では真性糖尿病ともいわれる）（例えば、Ｉ型糖尿病、ＩＩ型糖尿病、ＭＯＤＹ、および妊娠性糖尿病）、前糖尿病、メタボリックシンドローム、満腹、および、例えば、加齢からくる内分泌異常が含まれるがこれらに限定されない。代謝性障害のさらなる例には、過食症、食欲不振、トリグリセリド貯蔵疾患、バルデー－ビードル症候群、ローレンス－ムーン症候群、プラーダ－ラブハート－ウィリー症候群、カーンズ－セイヤー症候群、拒食症、中鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損、および悪液質が含まれるがこれらに限定されない。ある実施形態において、代謝性障害はコエンザイムＱ１０反応性状態である。

【００７６】

「代謝性障害を処置、減少、または予防する」ことにより、このような状態を、それが起こる前または起こった後で緩和することが意味される。等価な未処置対照と比較した場合に、このような減少または予防の程度は、任意の標準的な技術によって測定されるように、少なくとも５％、１０％、２０％、４０％、５０％、６０％、８０％、９０％、９５％、または１００％である。

【００７７】

真性糖尿病は、血糖の慢性的な上昇（高血糖）をもたらす代謝性疾患の異質な一群である。糖尿病は、グルコース調節の損失をもたらす、膵島の破壊または機能不全によって特徴付けられる。２つの主要な型の真性糖尿病は、「インスリン依存性糖尿病」（「ＩＤＤＭ」）または「若年発症型糖尿病」としてもまた知られるＩ型糖尿病、および「インスリン非依存性糖尿病」（「ＮＩＤＤＭ」）または「成人発症型糖尿病」としてもまた知られるＩＩ型糖尿病である。

【００７８】

「Ｉ型糖尿病」は、高血糖を生じる、インスリン産生の結果的な損失を伴う、自己免疫媒介性の膵臓β細胞の破壊から生じる状態である。Ｉ型糖尿病は、生存を確実にするために、インスリン補充療法を必要とする。注射用インスリンおよび経口血糖降下薬などの医薬は、糖尿病患者をより長く生かすことを可能にするが、糖尿病は、心臓病および癌に次ぐ第３の主要な死亡要因のままである。しかし、これらの医薬は、高血糖レベルと低血糖レベルの間の揺れを妨害するために完全に十分な血糖レベルを制御せず、腎臓、眼、および血管に損傷を生じる。糖尿病のコントロールと合併症に関する臨床試験（Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｃｏｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｔｒｉａｌ）（ＤＣＣＴ）は、血糖の強烈な制御が、１日あたり１回もしくは２回のインスリン注射からなる従来の治療と比較して、網膜症、腎症、および神経障害などの糖尿病の合併症を有意に遅延することを示す。ＤＣＣＴにおける強烈な治療は、１日あたり３回以上のインスリンの複数注射、または外部ポンプによる連続皮下インスリン注入（ＣＳＩＩ）を含んだ。インスリンポンプは、インスリンの生理学的置き換えに近似するために皮下の複数毎日注射（ＭＤＩ）に対する種々の代替的アプローチの１つである。

【００７９】

「２型糖尿病」とは、患者が１２５ｍｇ／ｄｌ（６．９４ｍｍｏｌ／Ｌ）よりも高い空

腹時血糖または血清グルコースの濃度を有する状態をいう。ＩＩ型糖尿病は、正常レベルより高レベルの血漿インスリンの存在下で高血糖によって特徴付けられ、すべての症例の９０％より多くを表し、最も頻繁には過体重の４０歳より上の成人で起こる。ＩＩ型糖尿病の進行は血糖の濃度の増加と関連し、グルコース誘導性インスリン分泌の速度の相対的な減少と連動している。ＩＩ型糖尿病において、炭水化物代謝を制御する組織プロセスは、インスリンに対する感受性の減少を有すると考えられており、それゆえに、インスリン産生の欠如からは起こらず、血中のグルコースレベルの増加に対する感受性の減少およびインスリンを産生することによって応答する能力のなさから起こる。あるいは、糖尿病は、インスリンの標的細胞上でのインスリンの作用を媒介する分子機構における種々の欠損、例えば、それらの細胞表面上のインスリン受容体の欠如から生じるのかもしれない。それゆえに、ＩＩ型糖尿病の治療は、頻繁にはインスリンの投与を必要としないが、例えば、スルホニルウレアなどの経口血糖降下薬を用いる治療によって増強される、食事およびライフスタイルの変化に基づいてもよい。

【００８０】

「前糖尿病」とは、患者が２型糖尿病の発症に対して前もって処置される状態をいう。前糖尿病は、損なわれた耐糖能の定義を拡張し、１００ｍｇ／ｄＬ以上の高い正常範囲内での絶食血糖（Ｍｅｉｇｓ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ ２００３ ５２：１４７５～１４８４）および空腹時高インスリン血（血漿インスリン濃度の上昇）を有する個体を含む。

【００８１】

「肥満」とは、患者が３０ｋｇ／ｍ^{2}以上のＢＭＩを有する状態をいう。「内臓型肥満」とは、男性患者では１．０、女性患者では０．８のウエスト対ヒップ比率をいう。別の態様において、内臓肥満は、インスリン抵抗性および前糖尿病の発症のリスクを規定する。

【００８２】

「過体重」とは、２５ｋｇ／ｍ^{2}以上かつ３０ｋｇ／ｍ^{2}未満のＢＭＩを有する患者をいう。「体重増加」とは、行動の習慣もしくは嗜癖、例えば、過食もしくは暴食、禁煙と関連した、または生物学的な（生命の）変化、例えば、男性における加齢および女性における閉経に伴う体重増加、もしく妊娠後の女性の体重増加と関連した、体重の増加をいう。

【００８３】

Ｘ症候群とも呼ばれる「メタボリックシンドローム」（ＭＳ）は、身体における他の経路および系に影響を与える代謝性障害をいう。もともと、メタボリックシンドロームは、心臓血管疾患を強化するように相乗作用する一群の代謝性障害（肥満、インスリン抵抗性、高血圧、および異常脂質血症、主に高トリグリセリド血症）として定義された。より最近では（２００１）、米国コレステロール教育プログラム（ｔｈｅ Ｕ．Ｓ．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｇｒａｍ）（ＮＣＥＰ）は、以下の５つの判断基準からのいずれか３つに合致するものとして「メタボリックシンドローム」を分類した：少なくとも１１０ｍｇ／ｄｌの空腹時グルコースレベル、少なくとも１５０ｍｇ／ｄｌの血漿トリグリセリドレベル（高トリグリセリド血症）、男性においては４０ｍｇ／ｄｌよりも下、女性においては５０ｍｇ／ｄｌよりも下のＨＤＬコレステロール、少なくとも１３０／８５ｍｍＨｇの血圧（高血圧）、および中心性肥満、中心性肥満は男性では４０インチより上、女性では３５インチよりも上の含む腰周りとして定義される。現在のところ、メタボリックシンドロームについて国際的に認められている定義が以下のように他に３つ存在する：１）世界保健機関（Ｗｏｒｌｄ Ｈｅａｌｔｈ Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ）２）米国心臓協会（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｈｅａｒｔ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ）／国立心肺血液研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｈｅａｒｔ，Ｌｕｎｇ ａｎｄ ｂｌｏｏｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）（ＡＨＡ／ＮＨＬＢＩ）および３）国際糖尿病連合（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ）（ＩＤＦ）。ＷＨＯ、ＡＨＡ／ＮＨＬＢＩ、およびＩＤＦによるメタボリックシンドロームの定

義はＮＥＣＰの定義と非常に類似しており、すべてがこの症候群を定義するために同じ代謝パラメーターを使用しているが、ＷＨＯはまた、空腹時インスリンレベルの評価も含んでいる（Ｍｏｅｂｕｓ Ｓ ｅｔ ａｌ，Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｙ，６：１～１０，２００７；Ａｔｈｙｒｏｓ Ｖ Ｇ ｅｔ ａｌ，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｌｏｇｙ，１１７：２０４～２１０，２００７）。これらの異なる定義の中でこの症候群を有するとして分類される必要があるこれらの代謝パラメーターについての閾値のさらにわずかな違いは、これらの異なる定義に従うと、この症候群を有するか、または有さないという特定の被験体の異なる分類を生じ得る。また、ＭＳを伴う心臓血管疾患（ＣＶＤ）の有病率は使用される定義によって変動する。（Ｍｏｅｂｕｓ Ｓ ｅｔ ａｌ，Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｙ，６：１～１０，２００７；Ａｔｈｙｒｏｓ Ｖ Ｇ ｅｔ ａｌ，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｌｏｇｙ，１１７：２０４～２１０，２００７）。米国糖尿病学会（ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ）は、過体重５人のうち１人がメタボリックシンドロームに苦しんでいると見積もっている。

【００８４】

他の態様において、メタボリックシンドロームは、Ｘ症候群、インスリン抵抗性症候群、インスリン抵抗性高血圧、代謝高血圧症候群、代謝異常症候群を含むがこれらに限定されない、受け入れられている同義語によって説明される。メタボリックシンドロームの構成要素には、耐糖能異常、損なわれた耐糖能、損なわれた空腹時血清グルコース、損なわれた空腹時血糖、高インスリン血症、前糖尿病、肥満、内臓型肥満、高トリグリセリド血症、遊離脂肪酸の血清濃度の上昇、Ｃ反応性タンパク質の血清濃度の上昇、リポタンパク質の血清濃度の上昇、ホモシステインの血清濃度の上昇、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）－コレステロールの血清濃度の上昇、リポタンパク質関連ホスホリパーゼ（Ａ２）の血清濃度の上昇、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）－コレステロールの血清濃度の減少、ＨＤＬ（２ｂ）－コレステロールの血清濃度の減少、アディポネクチンの血清濃度の減少、およびタンパク尿が含まれるがこれらに限定されない（以下を参照のこと：Ｐｅｒｓｈａｄｓｉｎｇｈ ＨＡ．Ｐｅｒｏｘｉｓｏｍｅ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｏｒ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｇａｍｍａ：ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｔａｒｇｅｔ ｆｏｒ ｄｉｓｅａｓｅｓ ｂｅｙｏｎｄ ｄｉａｂｅｔｅｓ：ｑｕｏ ｖａｄｉｓ？Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ Ｄｒｕｇｓ．（２００４）１３：２１５～２８、およびそこに引用される参考文献）。

【００８５】

前述の代謝性障害の「重要な構成要素」には、損なわれた空腹時グルコースまたは損なわれた耐糖能、ウエスト周囲の増加、内臓脂肪含量の増加、空腹時血漿グルコースの増加、空腹時血漿トリグリセリドの増加、空腹時高密度リポタンパク質レベルの減少、血圧の増加、インスリン抵抗性、高インスリン血症、心臓血管疾患（またはその構成要素、例えば、動脈硬化症、冠動脈疾患、末梢血管疾患、または脳血管疾患）、うっ血性心不全、血漿ノルエピネフリンの上昇、心臓血管関連炎症因子の上昇、血管内皮機能不全を強化する血漿因子の上昇、高リポタンパク血症、動脈硬化症もしくはアテローム性動脈硬化症、過食症、高血糖、高脂質血症、および高血圧または高血圧症、食後の血漿トリグリセリドまたは遊離脂肪酸レベルの上昇、細胞の酸化ストレスの増加またはその血漿指標、循環凝固亢進状態の増加、肝脂肪変性、肝臓脂肪症（ｈｅｔａｐｔｉｃ ｓｔｅａｔｏｓｉｓ）、腎臓病および腎不全を含む腎疾患が含まれるがこれらに限定されない。

【００８６】

「インスリン抵抗性」とは、グルコース負荷への通常の応答を超えている循環インスリンレベルが正常血糖状態を維持するために必要とされる状態をいう（Ｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，ＪＡＭＡ．２００２，２８７：３５６～９）。インスリン抵抗性および治療に対してインスリン抵抗性を有する患者の応答は、インスリン抵抗性の信頼できる指標である、インスリン抵抗性に対する恒常性モデル評価（ＨＯＭＡ－ＩＲ）スコアを評価することによって定量されてもよい（Ｋａｔｓｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ

２００１，２４：３６２～５）。恒常性評価モデル（ＨＯＭＡ）－ＩＲスコアによるインスリン抵抗性の見積もりはＧａｌｖｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔ Ｍｅｄ １９９２，９：９２１～８において開示されている式、ＨＯＭＡ－ＩＲ＝［空腹時血清インスリン（μＵ／ｍＬ）］×［空腹時血漿グルコース（ｍｍｏｌ／Ｌ）／２２．５］によって計算されてもよい。

【００８７】

「高インスリン血症」は、被験体が、インスリン抵抗性を有し、正常血糖を有するかまたは有さず、空腹時または食後血清または血漿インスリン濃度が正常のインスリン抵抗性を有さないやせた個体のそれよりも上に上昇しており、＜１．０（男性）または＜０．８（女性）のウエストからヒップの比率を有する状態として定義される。

【００８８】

「損なわれた耐糖能」（ＩＧＴ）という用語は、耐糖能試験が行われたときに、正常と高血糖の間に含まれる血糖レベルを有する人を説明するために使用される。このような人は、彼らが糖尿病であると見なされていないにも関わらず、糖尿病を発症するリスクがより高い。例えば、損なわれた耐糖能とは、患者が１１０ｍｇ／ｄｌより大きくかつ１２６ｍｇ／ｄｌ（７．００ｍｍｏｌ／Ｌ）未満の空腹時血糖濃度もしくは空腹時血清グルコース濃度、または１４０ｍｇ／ｄｌ（７．７８ｍｍｏｌ／Ｌ）より大きくかつ２００ｍｇ／ｄｌ（１１．１１ｍｍｏｌ／Ｌ）未満の食事２時間後の血糖もしくは血清グルコース濃度を有する状態をいう。

【００８９】

「高血糖」（高い血液糖類）の状態は、血糖レベルが高すぎる状態である。典型的には、高血糖は、血糖レベルが１８０ｍｇ／ｄｌより上に上昇するときに起こる。高血糖の徴候には、頻尿、過度の口渇、およびより長い時間スパンでは、体重減少が含まれる。

【００９０】

「低血糖」（低い血液糖類）の状態は、血糖レベルが低すぎる状態である。典型的には、低血糖は、血糖レベルが７０ｍｇ／ｄｌよりも下に低下するときに起こる。低血糖の徴候には、不機嫌、四肢の無感覚（とりわけ、手および腕）、錯乱、身震い、または眩暈が含まれる。この状態は利用可能な量を超えた過度のインスリンが存在する場合に生じるので、これは、時折、インスリン反応といわれる。

【００９１】

本発明の方法および組成物は糖尿病などの代謝性障害を有するリスクがある任意の患者を診断するために有用である。代謝性障害（例えば、糖尿病または肥満）の発症が予防される患者は、このような診断を受けてもよいし、受けなくてもよい。当業者は、本発明の患者が標準的な試験に供されてもよく、または１つ以上のリスク要因の存在に起因して高いリスクがある患者であるとして、検査なしで同定されてもよいことを理解する。

【００９２】

代謝性障害の診断は、本明細書に記載されているものなどの、当該分野において公知である任意の標準的な方法を使用して実施される。糖尿病を診断するための方法は、例えば、米国特許番号６，５３７，８０６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。糖尿病は、例えば、グルコースおよびケトンレベル（脂肪の分解産物）を測定する尿検査（検尿）；血中のグルコースのレベルを測定する検査；耐糖能検査；および哺乳動物から収集された生物試料（例えば、血液、血清、または尿）中の代謝性障害に特徴的な分子マーカーを検出するアッセイ（例えば、糖尿病の場合においてはヘモグロビンＡｌｃ（ＨｂＡｌｃ）レベルの測定）を使用して診断および監視されてもよい。

【００９３】

代謝性障害について処置される患者は、医療実務者がこのような状態を有すると診断した人である。診断は、本明細書に記載されているものなどの任意の適切な手段によって実施されてもよい。糖尿病または肥満の発症が予防される患者は、このような診断を受けてもよいし、受けなくてもよい。当業者は、本発明の患者が標準的な検査に供されたかもしれないか、または、家族歴、肥満、特定の民族性（例えば、アフリカ系アメリカ人および

ヒスパニック系アメリカ人）、妊娠性糖尿病または９ポンドより重い赤ちゃんの出産、高血圧、肥満または糖尿病の素因がある病理学的状態を有すること、高い血液レベルのトリグリセリド、高い血液レベルのコレステロール、分子マーカーの存在（例えば、自己抗体の存在）、および年齢（４５歳を超える年齢）などの１つ以上のリスク因子の存在に起因して検査なしで高リスクであるとして同定されたかもしれないことを理解する。個体は、彼らの体重が、彼らの身長のために所望される最大体重よりも２０％（女性では２５％）以上である場合に肥満であると見なされる。１００ポンドを超える過体重である成人は、病的に肥満であると見なされる。肥満は、３０ｋｇ／ｍ^{2}を超える肥満度指数（ＢＭＩ）として定義される。

【００９４】

ランダム血漿グルコース検査（１日のうちの任意の時間に採取される）が２００ｍｇ／ｄＬ以上の値を示す場合、空腹時血漿グルコース検査が１２６ｍｇ／ｄＬ以上の値を示す場合（８時間後）、または人が水に溶解された７５グラムのグルコースを含む飲料を消費した2時間後に採取された血液試料中で、経口耐糖能検査（ＯＧＴＴ）が２００ｍｇ／ｄＬ以上の血漿グルコース値を示す場合に、患者は糖尿病のリスクがあるかまたは糖尿病であると診断される可能性がある。ＯＧＴＴは3時間の時間にわたる時間が決められた間隔で血漿グルコースを測定する。望ましくは、本発明に従って処置された糖尿病患者における血漿グルコースのレベルは、１６０～６０ｍｇ／ｄＬの間、１５０～７０ｍｇ／ｄＬの間、１４０～７０ｍｇ／ｄＬの間、１３５～８０ｍｇ／ｄＬの間、および好ましくは１２０～８０ｍｇ／ｄＬの間の範囲である。

【００９５】

任意に、２ヶ月および3ヶ月の間の平均血糖レベルを評価するヘモグロビンＡｌｃ（ＨｂＡｌｃ）検査が利用されてもよい。糖尿病ではない人は、典型的には、４％～６％の間の範囲のＨｂＡｌｃ値を有する。ＨｂＡｌｃの１％毎の増加で、血糖レベルは約３０ｍｇ／ｄＬ増加し、合併症のリスクは増加する。好ましくは、本発明に従って処置される患者のＨｂＡｌｃ値は、９％未満、７％未満、６％未満、および最も好ましくは、約５％まで減少される。したがって、処置される患者のＨｂＡｌｃレベルは、好ましくは、処置の前のこのようなレベルと比較して、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、またはそれ以上低減される。

【００９６】

妊娠性糖尿病は、典型的には、ＯＧＴＴの間に測定される血漿グルコース値に基づいて診断される。グルコースレベルは、通常、妊娠の間にはより低いので、妊娠における糖尿病の診断のための閾値は、妊娠の前の同じ人よりも低い。女性が以下の数字のいずれかに合致するかまたはこれを超える２つの血漿グルコースの読み取りを有する場合、彼女は妊娠性糖尿病である：９５ｍｇ／ｄＬの空腹時血漿グルコースレベル、１８０ｍｇ／ｄＬの１時間レベル、１５５ｍｇ／ｄＬの２時間レベル、または１４０ｍｇ／ｄＬの３時間レベル。

【００９７】

ケトン検査もまた、Ｉ型糖尿病を診断するために利用されてもよい。十分なインスリンがない場合にケトン類は血中に蓄積するので、これらは最終的には尿に蓄積する。高レベルの血中ケトンは、ケトアシドーシスと呼ばれる深刻な状態を生じる可能性がある。

【００９８】

米国糖尿病協会（ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ）のガイドラインによれば、２型糖尿病と診断されるためには、個体は、１２６ｍｇ／ｄｌ以上の空腹時血漿グルコースレベル、または２００ｍｇ／ｄｌ以上の２時間経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）血漿グルコース値を有さなければならない（Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ，２６：Ｓ５～Ｓ２０，２００３）。

【００９９】

前糖尿病と呼ばれる関連状態は、１００ｍｇ／ｄｌより上であるが１２６ｍｇ／ｄｌ未満の空腹時グルコースレベル、または１４０ｍｇ／ｄｌより上であるが２００ｍｇ／ｄｌ

未満の２時間ＯＧＴＴ血漿グルコースレベルを有するとして定義される。山のような証拠が、前糖尿病状態が心臓血管疾患を発症するためのリスク因子であり得ることを示唆している（Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ ２６：２９１０～２９１４，２００３）。損なわれた耐糖能または損なわれた空腹時グルコースともまたいわれる前糖尿病は、２型糖尿病、心臓血管疾患、および死亡を発症するための大きなリスク因子である。前糖尿病を効果的に処置することによって、２型糖尿病の発症を予防する治療的介入を開発することに大きな注目が集まってきた（Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｙ，２４：３６２～７１，２００４）。

【０１００】

肥満（およそ＞３０ｋｇ／ｍ^{2}の肥満度指数として一般には定義される）は、しばしば、高インスリン血症、インスリン抵抗性、糖尿病、高血圧、および異常脂質血症などの種々の病理学的状態と関連する。これらの状態の各々は、心臓血管疾患のリスクに寄与する。

【０１０１】

インスリン抵抗性、高血圧、および異常脂質血症とともに、肥満はメタボリックシンドローム（Ｘ症候群としても知られる）の構成要素と見なされており、これらは、一緒に相乗作用して心臓血管疾患を強化する。より最近では、米国コレステロール教育プログラム（ｔｈｅ Ｕ．Ｓ．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｇｒａｍ）は、会議にて、以下の５つの判断基準からのいずれか３つに合致するものとして「メタボリックシンドローム」を分類した：少なくとも１１０ｍｇ／ｄＬの空腹時グルコースレベル、少なくとも１５０ｍｇ／ｄＬの血漿トリグリセリドレベル（高トリグリセリド血症）、男性においては４０ｍｇ／ｄｌよりも下、女性においては５０ｍｇ／ｄｌよりも下のＨＤＬコレステロール、少なくとも１３０／８５ｍｍＨｇの血圧（高血圧）、および中心性肥満、中心性肥満は男性では４０インチより上、女性では３５インチよりも上の含む腹部腰周りとして定義される。

【０１０２】

当業者は、上記の試験のいずれかの使用、または当該分野において公知である任意の他の試験が本発明の治療的処置の有効性を監視するために使用されてもよいことを認識する。ヘモグロビンＡｌｃ（ＨｂＡｌｃ）レベルの測定は以前の２～３ヶ月の間に平均血糖の指標であるので、この試験は、糖尿病治療に対する患者の応答を監視するために使用されてもよい。

【０１０３】

本発明の治療方法は、患者におけるグルコースレベルまたは脂質レベルの減少において有効である。「グルコースレベルの減少」によって、未処置対照と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％グルコースレベルを減少することが意味される。望ましくは、グルコースレベルは、正常血糖レベルまで、すなわち、１５０～６０ｍｇ／ｄＬの間、１４０～７０ｍｇ／ｄＬの間、１３０～７０ｍｇ／ｄＬの間、１２５～８０ｍｇ／ｄＬの間、および好ましくは１２０～８０ｍｇ／ｄＬの間まで減少される。グルコースレベルのこのような減少は、血液からのグルコースのクリアランスに関連する生物学的活性の任意の１つを増加させることによって得られてもよい。したがって、グルコースレベルを減少させる能力を有する薬剤は、インスリンの産生、分泌、または作用を増加させてもよい。インスリンの作用は、例えば、末梢組織によるグルコースの取り込みを増加させることによって、および／または肝臓のグルコース産生を減少させることによって増加されてもよい。あるいは、本発明の薬剤は、腸からの炭水化物の吸収を減少させ、グルコーストランスポーター活性を変化させ（例えば、ＧＬＵＴ４発現、固有活性、または移行を増加させることによって）、インスリン感受性組織の量を増加させ（例えば、筋肉細胞または脂肪細胞分化を増加させることによって）、または脂肪細胞もしくは筋肉細胞における遺伝子転写を変化させてもよい（例えば、代謝経路遺伝子の脂肪細胞発現からの因子の分泌の変化）。望ましくは、本発明の薬剤は、グルコースクリアランスに関連する活性の１つより多くを増加す

る。「脂質レベルの減少」によって、未処置対照と比較して、少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％脂質のレベルを減少することが意味される。

【０１０４】

「グルコースレベルが減少するようにインスリンシグナル伝達経路を変化させる」によって、全体の結果が血漿からのグルコースのクリアランスの増加であるように、インスリンシグナル伝達に関与する活性のいずれか１つを変化させる（増加または減少させることによって）ことが意味される。例えば、本発明のｅｎｖ影響因子は、インスリンシグナル伝達経路を変化させ、インスリンの産生、分泌、もしくは作用の増加、末梢組織によるグルコースの取り込みの増加、肝臓グルコース産生の減少、または腸からの炭水化物の吸収の減少を引き起こす。

【０１０５】

環境影響因子、例えば、エピシフターがグルコースレベルを減少させ、それによって代謝性障害を処置する能力は、当該分野において公知である標準的なアッセイを使用して評価されてもよい。例えば、グルコースの取り込みを増加させる薬剤を同定する細胞ベースのスクリーニングアッセイが利用されてもよい。特に、細胞培養中の分化した脂肪細胞が、放射性標識されたグルコースによって検出されるように、インスリン刺激の際にグルコースの取り込みを増加するエピシフターの能力を評価するために利用できる。別の例示的なアッセイにおいて、非糖尿病被験体に由来する細胞の条件付き不死化によって得られたヒト筋芽細胞が、インスリンを陽性対照として使用して、グリコーゲン合成に対する薬剤の効果をスクリーニングするために使用できる。処置の前に、細胞は血清飢餓状態にされ、次いで、２時間の時間の間、放射性標識されたグルコースを含む無血清培地中で、エピシフターまたは対照のいずれかを用いてインキュベートされ、その後、グリコーゲン合成が測定される。例示的なアッセイは実施例においてさらに説明される。

【０１０６】

ＩＩ．環境影響因子

本発明は、環境影響因子の投与によって代謝性障害を処置する方法を提供する。「環境影響因子（Ｅｎｖ－ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｒｓ）」は、有効な方法でヒトの疾患環境に影響を及ぼすかまたはヒトの疾患環境を調節する分子であり、これによりヒトの疾患環境を、正常な環境または正常な状態に通じる健康な環境にシフトさせる、そのような環境に戻して再度確立させる、あるいはそのような環境を維持することが可能となる。ｅｎｖ影響因子は、下で定義するような多次元細胞内分子（ＭＩＭ）およびエピメタボリックシフター（エピシフター）の両方を含む。

【０１０７】

１．多次元細胞内分子（ＭＩＭ）

「多次元細胞内分子（ＭＩＭ）」という用語は、体によって自然に産生されるおよび／またはヒトの少なくとも１つの細胞中に存在する内因性分子の単離されたものまたは合成産生されたものである。ＭＩＭは、以下の機能の１つ以上、２つ以上、３つ以上、またはすべてによって特徴付けられる。ＭＩＭは細胞に進入することが可能であり、細胞への進入は、分子の生物活性部分が完全に細胞に進入する限り、細胞への完全または部分進入を含む。ＭＩＭは、細胞内でシグナル伝達および／または遺伝子発現機構を誘導することが可能である。ＭＩＭは、治療薬および担体の両方、例えば薬物送達効果を有するという点で多次元である。ＭＩＭはまた、疾患状態において１つの方法で作用し、正常な状態においては異なる方法で作用するという点で多次元である。例えばＣｏＱ－１０の場合、ＶＥＧＦの存在下での黒色腫細胞へのＣｏＱ－１０の投与は、Ｂｃｌ２レベルの低下をもたらし、次に黒色腫細胞の発癌能の低下をもたらす。対照的に、正常な線維芽細胞において、ＣｏＱ－１０およびＶＥＦＧの同時投与は、Ｂｃｌ２のレベルに対する効果は有さない。好ましくはＭＩＭは、疾患状態の細胞において選択的に作用し、正常な状態の（マッチング）細胞において実質的に効果を有さない。好ましくはＭＩＭは、疾患状態の細胞を、表現型、代謝状態、遺伝子型、ｍＲＮＡ／タンパク質発現レベルなどで正常な状態の（マッ

チング細胞）に選択的に近づける。

【０１０８】

１実施形態において、ＭＩＭはエピシフターでもある。別の実施形態において、ＭＩＭはエピシフターではない。当業者は、本発明のＭＩＭが２つ以上の内因性分子の混合物を含むことも意図され、混合物が上述の機能の１つ以上によって特徴付けられることを認識するであろう。混合物中の内因性分子は、混合物がＭＩＭとして機能するような比で存在する。

【０１０９】

ＭＩＭは、脂質ベース分子または非脂質ベース分子であることができる。ＭＩＭの例は、限定されるわけではないが、ＣｏＱ１０、アセチルＣｏ－Ａ、パルミチルＣｏ－Ａ、Ｌ－カルニチン、例えばチロシン、フェニルアラニン、およびシステインなどのアミノ酸を含む。１実施形態において、ＭＩＭは小型分子である。本発明の１実施形態において、ＭＩＭはＣｏＱ１０でない。ＭＩＭは、本明細書で詳細に記載されたアッセイのいずれかを使用して、当業者によって日常的に同定することができる。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、ビタミンＢファミリーの化合物、またはビタミンＢファミリーの化合物を備えるヌクレオシド、モノヌクレオチドもしくはジヌクレオチドを含む。ビタミンＢファミリーの化合物は、例えばチアミン（ビタミンＢ１）、ナイアシン（ニコチン酸またはビタミンＢ３としても公知）、またはピリドキシン（ビタミンＢ６）ならびにパンテノール（プロビタミンＢ５）などのプロビタミンを含む。いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、チアミン、ナイアシンおよびピリドキシンからなる群より選択される。ビタミンＢファミリーの化合物を備えるヌクレオシド、モノヌクレオチドまたはジヌクレオチドは例えば、アデニンまたはナイアシン（ニコチン酸）分子を含むヌクレオシド、モノヌクレオチドまたはジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、アデノシン、アデノシン２リン酸（ＡＤＰ）、フラビンアデノシンジヌクレオチド（ＦＡＤ、ビタミンＢ２およびＡＤＰの一部を備える）およびニコチン酸ジヌクレオチドからなる群より選択される。

【０１１１】

他の実施形態において、ＭＩＭはアミノ酸を含む。例示的なアミノ酸としては、例えば、チロシン（例えば、Ｌ－チロシン）、システイン、フェニルアラニン（例えば、Ｌ－フェニルアラニン）、およびアラニンが挙げられる。いくつかの実施形態において、アミノ酸はフェニルアラニンまたはアラニンである。いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸またはアセチルグリシンなどのアミノ酸誘導体を含む。

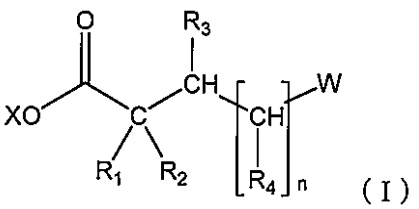
【０１１２】

いくつかの実施形態において、ＭＩＭはグルコース類似体、例えば１個の－ＯＨまたは－CH_2OH置換基が－ＣＯＯＨ、－COO^-または－NH_2置換基によって置換されているグルコース分子である。グルコース類似体の例は、グルコサミン、グルクロン酸、グルクロニドおよびグルクロン酸塩を含む。

【０１１３】

いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、式（Ｉ）の化合物から選択され：

【化１】

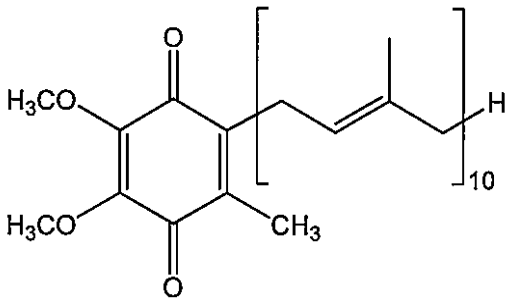


（Ｉ）

【０１１４】

式中

ｎは０または１の整数であり；
Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}およびＲ^{4}は存在するとき、水素およびヒドロキシルからそれぞれ独立して選択される、またはＲ^{1}およびＲ^{2}は、これらが結合されている炭素と共にまとめられてカルボニル（Ｃ＝Ｏ）基を形成し；
Ｗは－ＣＯＯＨまたは－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}^{+}$であり；ならびに
Ｘは、水素、負の電荷またはＮａ$^{+}$などのアルカリ金属カチオンである。
【０１１５】
ｎが０であるとき、ＣＨＲ^{3}基がＷ置換基に結合されていることが理解される。
【０１１６】
いくつかの実施形態において、Ｗは－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}^{+}$である。いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、Ｌ－カルニチンなどのカルニチンである。
【０１１７】
いくつかの実施形態において、ＭＩＭはジカルボン酸である。いくつかの実施形態において、Ｗは－ＣＯＯＨである。いくつかの実施形態において、Ｒ^{3}は水素である。いくつかの実施形態において、ｎは０である。いくつかの実施形態において、Ｒ^{1}およびＲ^{2}はそれぞれ独立して水素である。いくつかの実施形態において、Ｗは－ＣＯＯＨであり、Ｒ^{3}は水素であり、ｎは０であり、ならびにＲ^{1}およびＲ^{2}はそれぞれ独立して水素である。いくつかの実施形態において、ｎは１である。いくつかの実施形態において、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、これらが結合されている炭素と共にまとめられてカルボニル（Ｃ＝Ｏ）基を形成する。いくつかの実施形態において、Ｒ^{4}は水素である。いくつかの実施形態において、Ｒ^{4}はヒドロキシルである。いくつかの実施形態において、Ｗは－ＣＯＯＨであり、Ｒ^{3}は水素であり、ｎは１であり、ならびにＲ^{1}およびＲ^{2}は、これらが結合されている炭素と共にまとめられてカルボニル（Ｃ＝Ｏ）基を形成する。
【０１１８】
いくつかの実施形態において、ＭＩＭはクレブス回路の中間体であり、過剰な中間体がクレブス回路を生産的な酸化的リン酸化に向けて操縦する。ＭＩＭである例示的なクレブス回路中間体は、コハク酸またはコハク酸塩、リンゴ酸またはリンゴ酸塩、およびα－ケトグルタル酸またはα－ケトグルタル酸塩を含む。
【０１１９】
いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、以下の構造を有する、ＣｏＱ１０の構成単位である：
【化２】



【０１２０】
それゆえ、ＣｏＱ１０の構成単位は、限定されるわけではないが、フェニルアラニン、チロシン、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニル酢酸、３－メトキシ－４－ヒドロキシマンデル酸、バニリン酸、４－ヒドロキシベンゾエート、メバロン酸、ファルネシル、２，３－ジメトキシ－５－メチル－ｐ－ベンゾキノン、ならびに対応するその酸またはイオンを含む。いくつかの実施形態において、ＭＩＭは、フェニルアラニン、チロシン、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニル酢酸および４－ヒドロキシベンゾエートからなる群より選択される。
【０１２１】

（ｉ）ＭＩＭを同定する方法

本発明は、ＭＩＭを同定する方法を提供する。ＭＩＭを同定する方法は、細胞への内因性分子の外部からの添加および内因性分子の細胞、例えば細胞微小環境プロフィールに対する効果の評価を包含する。細胞に対する効果は細胞、ｍＲＮＡ、タンパク質、脂質、および／または代謝産物レベルの１つ以上で評価されて、細胞微小環境プロフィールにおける改変を同定する。１実施形態において、細胞は例えばインビトロで培養された培養細胞である。１実施形態において、細胞は生物中に存在する。内因性分子は、細胞に単一の濃度で添加され得る、または細胞に一連の濃度にわたって添加され得る。１実施形態において、内因性分子は対照の未処置細胞中の内因性分子のレベルと比較して、細胞中の内因性分子のレベルが上昇するように細胞に添加される（例えば１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、２．０倍、３．０倍、４．０倍、５．０倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、５０倍またはそれ以上、上昇する）。

【０１２２】

例えば形態、生理機能、および／または組成（例えばｍＲＮＡ、タンパク質、脂質、代謝産物）のいずれか１つ以上における改変により検出されるような、細胞中の変化を誘導する分子は、細胞微小環境プロフィールに対して誘導された変化が疾患細胞状態と正常な細胞状態との間で異なるか否かを判定するためにさらに評価され得る。多様な組織源、細胞タイプ、または疾患状態の細胞（例えば細胞培養系統）が、比較評価のために評価され得る。例えば癌細胞の細胞微小環境プロフィールにおける誘導された変化は、非癌性または正常な細胞に誘導された変化と比較され得る。細胞の微小環境プロフィールにおける変化を誘導すること（例えば細胞の形態、生理機能および／または組成、例えばｍＲＮＡ、タンパク質、脂質もしくは代謝産物の変化を誘導する）および／または正常な細胞と比較して罹患細胞の微小環境プロフィールにおける変化を示差的（例えば優先的）に誘導することが観察される内因性分子は、ＭＩＭとして同定される。

【０１２３】

本発明のＭＩＭは、脂質ベースＭＩＭまたは非脂質ベースＭＩＭであり得る。脂質ベースＭＩＭを同定する方法は、脂質ベース内因性分子が細胞に外部から添加される上記の細胞ベース方法を包含する。好ましい実施形態において、脂質ベース内因性分子は、細胞中の脂質ベース内因性分子のレベルが上昇するように、細胞に添加される。１実施形態において、脂質ベース内因性分子のレベルは、未処置対照細胞のレベルと比較して、１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、２．０倍、３．０倍、４．０倍、５．０倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、５０倍またはそれ以上、上昇する。脂質ベース分子の製剤および細胞への送達は、試験された各分子の特性に依存するが、多くの方法が当分野で公知である。脂質ベース分子の製剤および送達の例は、限定されるわけではないが、共溶媒による可溶化、担体分子、リポソーム、分散剤、懸濁剤、ナノ粒子分散剤、乳剤、例えば水中油型または油中水型乳剤、多相乳剤、例えば油中水中油型乳剤、ポリマー捕捉および封入を含む。脂質ベースＭＩＭの細胞への送達は、質量分析法などの当分野で公知の所定の方法による、細胞脂質の抽出およびＭＩＭの定量によって確認することができる。

【０１２４】

非脂質ベースＭＩＭを同定する方法は、非脂質ベース内因性分子が細胞に外部から添加される上記の細胞ベース方法を包含する。好ましい実施形態において、非脂質ベース内因性分子は、細胞中の非脂質ベース内因性分子のレベルが上昇するように、細胞に添加される。１実施形態において、非脂質ベース内因性分子のレベルは、未処置対照細胞のレベルと比較して、１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、２．０倍、３．０倍、４．０倍、５．０倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、３５倍、４０倍、４５倍、５０倍またはそれ以上、上昇する。非脂質ベース分子の製剤および細胞への送達は、試験された各分子の特性に依存するが、多くの方法が当分野で公知である。非脂質ベースの分子の製剤および送達の様式の例には、

共溶媒による可溶化、担体分子、能動輸送、ポリマー捕捉または吸着、ポリマーグラフト化、リポソーム封入およびターゲット化送達系を用いた製剤を含むがこれらに限定されない。非脂質ベースＭＩＭの細胞への送達は、質量分析法などの当分野で公知の所定の方法による、細胞内容物の抽出およびＭＩＭの定量によって確認され得る。

【０１２５】

２．エピメタボリックシフター（エピシフター）

本明細書で使用する場合、「エピメタボリックシフター」（エピシフター）は、健常（または正常な）状態から疾患状態へのおよびまたはその逆の代謝シフトを調節して、これによりヒトにおける細胞、組織、器官系および／または宿主の健康を維持または再建する分子（内因性または外因性）である。エピシフターは、組織微小環境の正常化を達成することができる。例えば、エピシフターは、細胞に添加されたまたは細胞で消耗されたときに、細胞の微小環境（例えば代謝状態）に影響を及ぼすことができるいずれの分子も含む。当業者は、本発明のエピシフターが２つ以上の分子の混合物を含むことも意図され、混合物が上述の機能の１つ以上によって特徴付けられることを認識するであろう。混合物中の分子は、混合物がエピシフターとして機能するような比で存在する。エピシフターの例は、限定されるわけではないが、ＣｏＱ－１０；ビタミンＤ３；フィブロネクチンなどのＥＣＭ構成要素；ＴＮＦαまたはインターロイキンのいずれかなどの免疫調節薬、例えばＩＬ－５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３；血管形成因子；およびアポトーシス因子を含む。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、エピシフターは、クレブス回路における１つ以上の反応への触媒作用に直接関与する、またはクレブス回路中間体（過剰な中間体がクレブス回路を操縦する）を産生するかのどちらかである酵素などの、酵素である。いくつかの実施形態において、酵素は、トランスアルドラーゼ、またはトランスケトラーゼなどのペントースリン酸経路の非酸化的段階の酵素である。他の実施形態において、酵素は、シンターゼまたはリガーゼなどの、クレブス回路を容易にする構成要素酵素または酵素複合体である。例示的な酵素は、スクシニルＣｏＡシンターゼ（クレブス回路酵素）またはピルビン酸カルボキシラーゼ（クレブス回路中間体であるオキサロ酢酸（ＯＡＡ）を形成するために、ピルビン酸の可逆的カルボキシル化を触媒するリガーゼ）を含む。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、エピシフターはＣｏＱ１０の構成単位である。ＣｏＱ１０の構成単位は、限定されるわけではないが、フェニルアラニン、チロシン、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニル酢酸、３－メトキシ－４－ヒドロキシマンデル酸、バニリン酸、４－ヒドロキシベンゾエート、メバロン酸、ファルネシル、２，３－ジメトキシ－５－メチル－ｐ－ベンゾキノン、ならびに対応するその酸またはイオンを含む。いくつかの実施形態において、エピシフターは、フェニルアラニン、チロシン、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニル酢酸および４－ヒドロキシベンゾエートからなる群より選択される。

【０１２８】

いくつかの実施形態において、エピシフターはビタミンＢファミリーの化合物である。ビタミンＢファミリーの化合物は例えば、リボフラビン（ビタミンＢ２）、またはその類似体を含む。エピシフターは、本明細書に記載する内因性ＭＩＭなどの、内因性ＭＩＭのいずれにもインビボで代謝され得る、いずれの類似体またはプロドラッグも含む。

【０１２９】

１実施形態において、エピシフターもＭＩＭである。１実施形態において、エピシフターはＣｏＱ１０でない。エピシフターは、本明細書で詳細に記載されたアッセイのいずれかを使用して、当業者によって日常的に同定することができる。

【０１３０】

（ｉ）エピシフターを同定する方法

エピメタボリックシフター（エピシフター）は、細胞の代謝状態を調節する、例えば健常（または正常な）状態から疾患状態へのおよびまたはその逆の代謝シフトを誘導するこ

とが可能である分子であり、これによりヒトにおける細胞、組織、器官系および／または宿主の健康を維持または再建することが可能である。本発明のエピシフターはそれゆえ、罹患状態の診断評価に有用性を有する。本発明のエピシフターは、エピシフターの適用または投与（他の治療分子によるエピシフターの調節）効果が組織微小環境および疾患状態における正常化をもたらす治療用途においてさらなる有用性を有する。

【０１３１】

エピメタボリックシフターの同定は概して、示差的な疾患状態、進行、または侵襲性を提示する細胞または組織のパネルについて、例えば代謝産物、脂質、タンパク質またはＲＮＡの分子プロフィール（個別のまたは併用されたプロフィール）を確立することを包含する。レベルの変化（例えばレベルの上昇または低下）が疾患状態、進行または侵襲性に相関するプロフィールからの分子は、潜在的エピシフターとして同定される。

【０１３２】

１実施形態において、エピシフターはＭＩＭでもある。潜在的なエピシフターは、当分野で公知のいくつもの所定の技法を使用することによって、および本明細書に記載する方法のいずれかを使用することによって、細胞への外部からの添加時に細胞に進入するその能力が評価され得る。例えば、潜在的エピシフターの細胞中への進入は、質量分析法などの当分野で公知の所定の方法による、細胞内容物の抽出および潜在的エピシフターの定量によって確認され得る。これにより、細胞に進入することができる潜在的エピシフターは、ＭＩＭとして同定される。

【０１３３】

エピシフターを同定するために、潜在的エピシフターは次に、細胞の代謝状態をシフトする能力について評価される。潜在的エピシフターが細胞微小環境の代謝状態をシフトする能力は、細胞に潜在的エピシフターを導入すること（例えば外部から添加すること）ならびに細胞において：遺伝子発現の変化（例えばｍＲＮＡもしくはタンパク質発現の変化）、脂質もしくは代謝産物レベルの濃度変化、生体エネルギー分子レベルの変化、細胞エネルギー特性の変化、および／またはミトコンドリアの機能もしくは数の変化の１つ以上を監視することによって評価される。細胞微小環境の代謝状態をシフトすることが可能である潜在的エピシフターは、本明細書で詳細に記載されたアッセイのいずれかを使用して、当業者によって日常的に同定することができる。潜在的エピシフターは、罹患細胞の代謝状態を正常な健常状態に向けてシフトする能力について（または反対に、正常細胞の代謝状態をを罹患状態に向けてシフトする能力について）、さらに評価される。それゆえ、罹患細胞の代謝状態を正常な健常状態に向けてシフトする（または健常な正常細胞の代謝状態を罹患状態に向けてシフトする）ことが可能である潜在的エピシフターは、エピシフターとして同定される。好ましい実施形態において、エピシフターは、正常細胞の健康および／または増殖に悪影響を及ぼさない。

【０１３４】

本発明のエピメタボリックシフターは、限定されるわけではないが、小型分子代謝産物、脂質ベース分子、ならびにタンパク質およびＲＮＡを含む。小型分子内因性代謝産物のクラスでエピメタボリックシフターを同定するために、示差的な疾患状態、進行、または侵襲性を提示する細胞または組織のパネルについて、代謝産物プロフィールが確立される。各細胞または組織の代謝産物プロフィールは、細胞または組織から代謝産物を抽出することならびに次に例えば液体－クロマトグラフィー連結質量分析法またはガスクロマトグラフィー連結質量分析法を含む、当業者に公知の所定の方法を使用して、代謝産物を同定および定量することによって決定される。レベルの変化（例えばレベルの上昇または低下）が疾患の状態、進行または侵襲性に相関する代謝産物は、潜在的エピシフターとして同定される。

【０１３５】

内因性脂質ベース分子のクラスでエピメタボリックシフターを同定するために、示差的な疾患状態、進行、または侵襲性を提示する細胞または組織のパネルについて、脂質プロフィールが確立される。各細胞または組織の脂質プロフィールは、脂質抽出法と、続いて

の例えば液体－クロマトグラフィー連結質量分析法またはガスクロマトグラフィー連結質量分析法を含む、当業者に公知の所定の方法を使用する脂質の同定および定量によって決定される。レベルの変化（大量または微量レベルの上昇または低下）が疾患の状態、進行または侵襲性に相関する脂質は、潜在的エピシフターとして同定される。

【０１３６】

タンパク質およびＲＮＡのクラスでエピメタボリックシフターを同定するために、示差的な疾患状態、進行、または侵襲性を提示する細胞または組織のパネルについて、遺伝子発現プロフィールが確立される。各細胞または組織の発現プロフィールは、例えば本明細書に詳細に記載されているような標準プロテオミクス法、ｍＲＮＡアレイ法、またはゲノムアレイ法を使用して、ｍＲＮＡレベルおよび／またはタンパク質レベルで決定される。発現の変化（例えばｍＲＮＡまたはタンパク質レベルでの発現の上昇または低下）が疾患の状態、進行または侵襲性に相関する遺伝子は、潜在的エピシフターとして同定される。

【０１３７】

（例えば可溶性代謝産物、脂質ベース分子、タンパク質、ＲＮＡ、または他の生物学的クラスの組成物について）上記の分子プロフィールがいったん確立されると、細胞および生化学経路分析が行われて、細胞環境における同定された潜在的エピシフターの間の公知の連関が解明される。このような細胞および／または生化学経路分析によって得られた本情報は、経路および潜在的エピシフターを分類するために利用され得る。

【０１３８】

エピシフターが疾患状態を調節する有用性は、当分野で公知のまたは本明細書で詳細に記載されたいくつものアッセイを使用して、当業者がさらに評価および確認することができる。エピシフターが疾患状態を調節する有用性は、エピシフターの細胞または生物への直接外因性送達によって評価することができる。エピシフターが疾患状態を調節する有用性はあるいは、エピシフター（例えばエピシフターのレベルまたは活性）を直接調節する分子の発生によって評価することができる。エピシフターが疾患状態を調節する有用性はまた、エピシフターと同じ経路に配置された（例えばＲＮＡまたはタンパク質レベルで調節される）遺伝子などの他の分子を調節することによる、エピシフター（例えばエピシフターのレベルまたは活性）を間接的に調節する分子の発生によって評価することができる。

【０１３９】

本明細書に記載するエピメタボローム手法は、細胞微小環境に存在し、そのレベルが遺伝子機構、ｍＲＮＡ機構、またはタンパク質ベース機構を通じて検知および管理される内因性分子の同定を容易にする。本発明のエピシフターが引き起こす、正常細胞で見出される調節応答経路は、誤調節または罹患細胞環境における治療価値を提供し得る。加えて、本明細書に記載するエピメタボリック手法は、臨床患者選択における、疾患診断キットにおける、または予後指標としての使用のための診断指示を提供し得るエピシフターを同定する。

【０１４０】

ＩＩＩ．ＭＩＭ／エピシフターを同定するのに有用なアッセイ

目的の分子および化合物を分離および同定するために用いた本発明の技法および方法は、限定されるわけではないが：液体クロマトグラフィー（ＬＣ）、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、質量分析（ＭＳ）、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）、液体クロマトグラフィー／質量分析（ＬＣ－ＭＳ）、ガスクロマトグラフィー／質量分析（ＧＣ－ＭＳ）、核磁気共鳴（ＮＭＲ）、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、フーリエ変換赤外（ＦＴ－ＩＲ）、および誘導結合プラズマ質量分析（ＩＣＰ－ＭＳ）を含む。質量分析技法は、限定されるわけではないが、扇形磁場２重収束型装置、透過型４重極装置、４重極イオントラップ型装置、飛行時間型装置（ＴＯＦ）、フーリエ変換サイクロトロン共鳴型装置（ＦＴ－ＭＳ）およびマトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）の使用を含むことが、さらに理解される。

【０１４１】

生体エネルギー分子レベルの定量：

環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、候補エピシフターが適用された細胞の細胞生体エネルギー分子レベル（例えばＡＴＰ、ピルビン酸、ＡＤＰ、ＮＡＤＨ、ＮＡＤ、ＮＡＤＰＨ、ＮＡＤＰ、アセチルＣｏＡ、ＦＡＤＨ２）の変化によって同定され得る。生体エネルギー分子レベルの例示的なアッセイは、比色（ｃｏｌｏｒｏｍｅｔｒｉｃ）、蛍光、および／または生物発光ベースの方法を使用する。このようなアッセイの例は下で提供される。

【０１４２】

細胞内のＡＴＰのレベルは、当分野で公知のいくつかのアッセイおよび系を用いて測定することができる。例えば１つの系において、溶解細胞から放出された細胞質ＡＴＰは、ルシフェリンおよび酵素ルシフェラーゼと反応して、光を産生する。本生物発光はバイオルミノメータによって測定され、溶解細胞の細胞内ＡＴＰ濃度を計算することができる（ＥｎｚｙＬｉｇｈｔ（商標）ＡＴＰアッセイキット（ＥＡＴＰ－１００）、ＢｉｏＡｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ）。別の系において、例えばＡＴＰおよびその脱リン酸化型のＡＤＰの両方が生物発光を介して計算される；ＡＴＰレベルが計算された後、ＡＤＰはＡＴＰに変換されて、次に同じルシフェラーゼ系（ＡｐｏＳＥＮＳＯＲ（商標）　ＡＤＰ／ＡＴＰ比アッセイキット、ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ　Ｉｎｃ．、Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）を使用して検出および計算される。

【０１４３】

ピルビン酸塩は、細胞代謝経路において重要な中間体である。ピルビン酸塩は、細胞の代謝状態に応じて、糖新生を介して炭水化物に変換され得るか、アセチルＣｏＡを介して脂肪酸に変換もしくは代謝され得るか、またはアラニンもしくはエタノールに変換され得る。それゆえピルビン酸塩レベルの検出は、細胞試料の代謝性活性および状態の尺度を提供する。ピルビン酸塩を検出する１つのアッセイは例えば、比色および蛍光定量の両方を使用して、異なる範囲内でのピルビン酸濃度を検出する（ＥｎｚｙＣｈｒｏｍ（商標）ピルビン酸アッセイキット（カタログ番号ＥＰＹＲ－１００）、ＢｉｏＡｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ）。

【０１４４】

環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、細胞中での生体エネルギー分子の発生および維持に関与している細胞中のミトコンドリアによって行われる、酸化的リン酸化のプロセスに影響を及ぼし得る。細胞培養物および試料の細胞エネルギー特性の変化を直接検出するアッセイ（後述する）に加えて、細胞中のミトコンドリアの別々の酵素および複合体に対する化合物の効果を検出および定量するアッセイが存在する。例えばＭＴ－ＯＸＣ　ＭｉｔｏＴｏｘ（商標）Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＯＸＰＨＯＳ活性アッセイ（ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）は、ミトコンドリアから抽出された複合体Ｉ～Ｖに直接適用された化合物の効果を検出および定量することができる。ＮＡＤＨデヒドロゲナーゼ（複合体Ｉ）、シトクロムｃオキシダーゼ（複合体ＩＶ）およびＡＴＰシンターゼ（複合体Ｖ）などの個別のミトコンドリア複合体に対する効果の検出および定量のアッセイも利用可能である（ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）。

【０１４５】

細胞エネルギー特性の測定：

環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、細胞エネルギー特性の変化によっても同定され得る。細胞エネルギー特性の測定の１例は、分子酸素の消費および／または細胞培養物の培地のｐＨの変化のリアルタイム測定である。例えば潜在的エピシフターが細胞の代謝状態を調節する能力は、例えばＸＦ２４アナライザ（Ｓｅａｈｏｒｓｅ，Ｉｎｃ．）を使用して分析され得る。本技術によって、細胞微小環境の生体エネルギーを評価するための、細胞の単層における酸素およびｐＨ変化のリアルタイム検出が可能となる。ＸＦ２４アナライザは、どちらも細胞エネルギー特性の主要な指標である、好気性代謝の尺度である酸素消費速度（ＯＣＲ）および解糖の尺度である細胞外酸化（ＥＣＡＲ）を

測定および比較する。

【０１４６】

酸化的リン酸化およびミトコンドリア機能の測定

酸化的リン酸化は、ミトコンドリアの膜に埋め込まれたタンパク質複合体を介して真核生物中で行われる栄養化合物の酸化を介して、ＡＴＰが発生されるプロセスである。大半の生物の細胞における主なＡＴＰ源として、酸化的リン酸化活性の変化は、細胞内での代謝およびエネルギーバランスを強力に改変することができる。本発明のいくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、酸化的リン酸化に対するその効果によって検出および／または同定され得る。いくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、限定されるわけではないが、電子輸送鎖およびＡＴＰ合成を含む、酸化的リン酸化の特異的な態様に対するその効果によって検出および／または同定され得る。

【０１４７】

酸化的リン酸化に関与するプロセスを行うミトコンドリア膜埋込みタンパク質複合体は、特異的タスクを実行し、Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶとナンバリングされる。これらの複合体は、内膜貫通膜ＡＴＰシンターゼ（複合体Ｖとしても公知）と共に、酸化的リン酸化プロセスに関与する主要な実体である。環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）の、一般にミトコンドリア機能、および特に酸化的リン酸化プロセスに対する効果を検査できるアッセイに加えて、個別の複合体に対するエピシフターの効果を、他の複合体と別に検査するために使用できるアッセイが利用可能である。

【０１４８】

ＮＡＤＨ－コエンザイムＱオキシドレダクターゼまたはＮＡＤＨデヒドロゲナーゼとしても公知の複合体Ｉは、電子輸送鎖中の第１のタンパク質である。いくつかの実施形態において、複合体ＩによるＮＡＤ$^{+}$の産生に対するエピシフターの効果の検出および定量が行われ得る。例えば複合体は、９６ウェルプレート中の試料から免疫捕捉することができる；ＮＡＤＨからＮＡＤ$^{+}$への酸化は、４５０ｎＭにて吸光度の上昇を有する染料分子の還元と同時に起こる（複合体Ｉ酵素活性マイクロプレート・アッセイ・キット、ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）。

【０１４９】

シトクロムｃオキシダーゼ（ＣＯＸ）としても公知の複合体ＩＶは、電子輸送鎖中の最後のタンパク質である。いくつかの実施形態において、シトクロムｃの酸化および複合体ＩＶによる酸素の水への還元に対するエピシフターの効果の検出および定量が行われ得る。例えばＣＯＸをマイクロウェルプレート中で免疫捕捉して、ＣＯＸの酸化を比色アッセイ（複合体ＩＶ酵素活性マイクロプレート・アッセイ・キット、ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）によって測定することができる。

【０１５０】

酸化的リン酸化プロセスの最後の酵素は、他の複合体によって生成されたプロトン勾配を使用して、ＡＤＰからのＡＴＰの合成を促進する、ＡＴＰシンターゼ（複合体Ｖ）である。いくつかの実施形態において、ＡＴＰシンターゼの活性に対するエピシフターの効果の検出および定量が行われ得る。例えば試料中のＡＴＰシンターゼの活性およびＡＴＰシンターゼの量はどちらも、マイクロウェル・プレート・ウェル中で免疫捕捉されたＡＴＰシンターゼについて測定され得る。酵素は、ある条件下でＡＴＰアーゼとしても機能することができ、それゆえＡＴＰシンターゼ活性についての本アッセイにおいて、ＡＴＰがＡＤＰに還元される速度は、ＮＡＤＨのＮＡＤ$^{+}$への同時酸化を検出することによって測定される。ＡＴＰの量は、ＡＴＰアーゼに標識された抗体を使用して計算される（ＡＴＰシンターゼ・デュプレクシング（活性＋量）マイクロプレート・アッセイ・キット、ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）。酸化的リン酸化の追加のアッセイは、複合体ＩＩおよびＩＩＩの活性に対する効果を試験するアッセイを含む。例えばＭＴ－ＯＸＣ　ＭｉｔｏＴｏｘ（商標）Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＯＸＰＨＯＳシステム（ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）を使用して、複合体ＩＩおよびＩ

ＩＩならびに複合体Ｉ、ＩＶおよびＶに対する効果を評価し、酸化的リン酸化系全体に対する化合物の効果についてのデータを提供することができる。

【０１５１】

上記のように、無処置細胞試料のリアルタイム観察は、細胞培養培地における酸素消費およびｐＨの変化のためのプローブを使用して行うことができる。細胞エネルギー特性のこれらのアッセイは、ミトコンドリア機能の大まかな概要および試料の細胞内のミトコンドリアの活性に対する潜在的環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）の効果を提供する。

【０１５２】

環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、ミトコンドリア膜透過性遷移孔（ＭＰＴＰ）の形成のために透過性の上昇を経験する現象である、ミトコンドリア膜透過性遷移（ＭＰＴ）にも影響を及ぼし得る。ミトコンドリア透過性の上昇は、ミトコンドリア膨潤、すなわち酸化的リン酸化およびＡＴＰ発生および細胞死の実行不能をもたらすことができる。ＭＰＴは、アポトーシスの誘導に関与し得る（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている、Ｈａｌｅｓｔｒａｐ，Ａ．Ｐ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．３４：２３２－２３７（２００６）およびＬｅｎａ，Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄ．７：１３－２６（２００９）を参照）。

【０１５３】

いくつかの実施形態において、ＭＰＴおよびＭＰＴＰの形成、中断および／または遂行に対する環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）の効果の検出および定量が測定される。例えばアッセイは、ミトコンドリアおよび他のサイトゾルコンパートメントの内膜内に局在する特殊化染料分子（カルセイン）の使用を通じて検出することができる。別の分子、$CoCl_2$の適用は、サイトゾル中でのカルセイン染料の蛍光をスケルチするよう働く。しかし$CoCl_2$はミトコンドリア内部にアクセスできず、それゆえＭＰＴが起こって、$CoCl_2$がＭＰＴＰを介してミトコンドリア内部にアクセスできない限り、ミトコンドリア中のカルセイン蛍光はスケルチされない。ミトコンドリア特異的蛍光シグナルの消失は、ＭＰＴの発生を通知する。フローサイトメトリが使用されて、細胞および細胞小器官の蛍光を評価することができる（ＭｉｔｏＰｒｏｂｅ（商標）遷移孔アッセイキット、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）。追加のアッセイは、実験結果を評価するために蛍光顕微鏡を利用する（Ｉｍａｇｅ－ｉＴ（商標） ＬＩＶＥミトコンドリア遷移孔アッセイキット、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）。

【０１５４】

細胞増殖および炎症の測定

本発明のいくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、細胞増殖および／または炎症に関連する分子の産生または活性に対するその影響によって同定および評価され得る。これらの分子は、限定されるわけではないが、サイトカイン、成長因子、ホルモン、細胞外マトリックスの構成要素、ケモカイン、神経ペプチド、神経伝達物質、ニューロトロフィンおよび細胞シグナル伝達に関与する他の分子、ならびにシグナル伝達に関与する細胞内分子などの細胞内分子を含む。

【０１５５】

血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）は、強力な血管形成特性、血管特性および分裂促進特性を有する成長因子である。ＶＥＧＦは内皮透過性および膨潤を刺激し、ＶＥＧＦ活性は、関節リウマチ、転移性癌、老年性黄斑変性および糖尿病性網膜症を含む多数の疾患および障害に関わっている。

【０１５６】

本発明のいくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、ＶＥＧＦの産生に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。例えば低酸素条件またはアシドーシスを模倣する条件で維持された細胞は、ＶＥＧＦ産生の向上

を呈するであろう。培地中に分泌されたＶＥＧＦは、ＥＬＩＳＡまたは、利用可能な抗ＶＥＧＦ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を使用する他の抗体ベースアッセイを使用してアッセイすることができる。本発明のいくつかの実施形態において、エピシフターは、細胞のＶＥＧＦへの応答性に対するその効果に基づいておよび／またはＶＥＧＦ受容体の発現もしくは活性に対するその効果に基づいて同定および／または特徴付けされ得る。

【０１５７】

腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）は、健常免疫系機能ならびに自己免疫疾患の両方に関わり、炎症および免疫系活性化の主要なメディエータである。本発明のいくつかの実施形態において、エピシフターは、ＴＮＦの産生または活性に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。例えば培養細胞により産生され、培地中に分泌されたＴＮＦは、ＥＬＩＳＡおよび当分野で公知の他の抗体ベースアッセイを介して定量することができる。さらに、いくつかの実施形態において、環境影響因子は、ＴＮＦの受容体（ヒトＴＮＦ　ＲＩ　Ｄｕｏｓｅｔ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）の発現に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。

【０１５８】

細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の構成要素は、細胞および組織の構造ならびにシグナル伝達プロセスの両方において役割を果たす。例えば潜在型形質転換成長因子ベータ結合タンパク質は、ＥＣＭ内に形質転換成長因子ベータ（ＴＧＦβ）のリザーバを生成するＥＣＭ構成要素である。マトリックス結合ＴＧＦβは、マトリックス再構築のプロセスの間に放出され、付近の細胞に成長因子効果を及ぼすことができる（Ｄａｌｌａｓ，Ｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１３９：２３１－２４３（２０００））。

【０１５９】

いくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、培養された細胞のＥＣＭの生成に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。研究者らは、細胞によるＥＣＭの生成、ならびにＥＣＭの組成を研究および定量することができる技法を開発してきた。例えば細胞によるＥＣＭの合成は、インキュベーションの前に細胞をハイドロゲルに埋込むことによって評価することができる。細胞によって発生したＥＣＭに対する生化学的分析および他の分析は、細胞収集およびハイドロゲルの消化の後に遂行される（Ｓｔｒｅｈｉｎ，Ｉ．ａｎｄ　Ｅｌｉｓｓｅｅｆｆ，Ｊ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．５２２：３４９－３６２（２００９））。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、生物中のＥＣＭまたはその構成要素の１つの産生、状態または欠失に対する環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）の効果は同定および特徴付けされ得る。別々の種類の細胞中でまたは発生のあるステージにおいてのみ特定のＥＣＭ遺伝子のノックアウトを可能にする条件的ノックアウト（ＫＯ）マウスを生成する技法が開発されている（Ｂｒａｎｃａｃｃｉｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏ．５２２：１５－５０（２００９））。特定の組織中でまたは発生の特定のステージにおける特定のＥＣＭ構成要素の活性または非存在に対するエピシフターまたは潜在的エピシフターの適用または投与の効果は、それゆえ評価され得る。

【０１６１】

原形質膜完全性および細胞死の測定

環境影響因子（例えばＭＩＭまたはエピシフター）は、細胞死の見込みの上昇または低下を証明する、アポトーシス、壊死もしくは細胞変化を受ける細胞試料の原形質膜完全性の変化および／または細胞の数もしくはパーセンテージの変化によって同定され得る。

【０１６２】

乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）のアッセイは、細胞ステータスおよび損傷のレベルの測定を提供することができる。ＬＤＨは、安定で比較的豊富な細胞質酵素である。原形質膜が物理的完全性を失うとき、ＬＤＨは細胞外コンパートメントへ逃れる。ＬＤＨのより高い濃度は、原形質膜損傷および細胞死のより高いレベルと相関する。ＬＤＨアッセイの

例は、試料中のＬＤＨのレベルを検出および定量する比色系を使用し、テトラゾリウム塩の還元型がＬＤＨ酵素の活性を介して産生されるアッセイを含む（ＱｕａｎｔｉＣｈｒｏｍ（商標）乳酸デヒドロゲナーゼキット（ＤＬＤＨ－１００）、ＢｉｏＡｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ；ＬＤＨ細胞傷害性検出キット、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）。

【０１６３】

アポトーシスは、多種多様の異なる開始イベントを有し得るプログラムされた細胞死のプロセスである。いくつかのアッセイを使用して、アポトーシスを受ける細胞の速度および／または数の変化を検出することができる。アポトーシスを検出および定量するために使用される１種類のアッセイは、カスパーゼ（ｃａｐａｓｅ）アッセイである。カスパーゼ（Ｃａｐａｓｅ）は、アポトーシスの間のタンパク質分解切断を介して活性化される、アスパラギン酸特異的システインプロテアーゼである。活性化カスパーゼ（ｃａｐａｓｅ）を検出するアッセイの例は、ＰｈｉＰｈｉＬｕｘ（登録商標）（ＯｎｃｏＩｍｍｕｎｉｎ，Ｉｎｃ．、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）およびＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ（登録商標）　３／７アッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を含む。比較試料中でアポトーシスを受けている細胞のパーセンテージまたは数の変化を検出できる追加のアッセイは、ＴＵＮＥＬ／ＤＮＡ断片化アッセイを含む。これらのアッセイは、アポトーシスの実行段階の間にヌクレアーゼによって発生した１８０～２００塩基対ＤＮＡフラグメントを検出する。例示的なＴＵＮＥＬ／ＤＮＡ断片化は、インサイチュー細胞死検出キット（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）およびＤｅａｄＥｎｄ（商標）比色および蛍光定量ＴＵＮＥＬシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を含む。

【０１６４】

いくつかのアポトーシスアッセイは、アポトーシスおよび／または非アポトーシス状態に関連するタンパク質を検出および定量する。例えばＭｕｌｔｉＴｏｘ－Ｆｌｕｏｒ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ細胞傷害性アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）は、単一基質の蛍光定量（ｆｌｕｏｒｉｍｅｔｒｉｃ）システムを使用して、生細胞および死細胞に特異的なプロテアーゼを検出および定量し、それゆえ細胞または組織試料における生細胞の、アポトーシスを受けた細胞に対する比を提供する。

【０１６５】

アポトーシスを検出または定量するために利用可能な追加のアッセイは、細胞透過性（例えばＡＰＯＰｅｒｃｅｎｔａｇｅ（商標）アポトーシスアッセイ、Ｂｉｏｃｏｌｏｒ、英国）およびアネキシンＶについてのアッセイ（例えばアネキシンＶ－ビオチンアポトーシス検出キット、ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ　Ｉｎｃ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）を含む。

【０１６６】

ＩＶ．本発明の使用

本発明は、被験体が代謝性障害に罹患しているか否かをアッセイするための方法を提供する。本発明の方法は、代謝性障害および／または代謝性障害について処置された被験体の生存を予後診断するために熟練の実務者によって使用される任意の他の方法と併せて実施することができる。例えば、本発明の方法は、被験体から得られた試料の形態学的または細胞学的分析と併せて実施されてもよい。細胞学的方法には、任意の他の分子マーカーの、それ自体の、他のマーカーと併せての、および／またはＳｈｃマーカーと組み合わせての免疫組織学的または免疫蛍光検出（および適切な場合、定量）が含まれる。他の方法には、インサイチュＰＣＲによる、または組織を抽出することおよびリアルタイムＰＣＲによって他のマーカーを定量することによる、他のマーカーの検出が含まれる。ＰＣＲはポリメラーゼ連鎖反応として定義される。

【０１６７】

被験体における代謝性障害を処置するための処置レジメンの有効性を評価するための方法もまた提供される。これらの方法において、試料対（第１の試料は処置レジメンに供さ

れておらず、第２の試料は処置レジメンの少なくとも一部に供されている）におけるマーカーの量が評価される。

【０１６８】

本明細書に記載される方法を使用して、特に、細胞膜を横切ることが可能であるように十分に小さい分子を含む種々の分子が、本発明のマーカーの発現および／または活性を調節、例えば、増加する分子を同定するためにスクリーニングされてもよい。そのように同定される化合物は、被験体における代謝性障害を阻害するために、または被験体における代謝性障害を処置するために、被験体に提供できる。

【０１６９】

Ｖ．本発明のマーカー

本発明は、表２～４および６～２９に列挙されるマーカー（本明細書中以後、「バイオマーカー」、「マーカー」、または「本発明のマーカー」）に関する。本発明は、マーカーによってコードされるか、またはマーカーに対応する核酸およびタンパク質（本明細書中以後、それぞれ、「マーカー核酸」および「マーカータンパク質」）を提供する。これらのマーカーは、代謝性障害の存在についてスクリーニングすること、被験体が代謝性障害を発症する素因があるか否かを予測すること、代謝性障害を処置するための化合物を同定すること、および代謝性障害を処置するための治療の有効性または環境影響因子化合物の有効性を評価することにおいて特に有用である。

【０１７０】

本発明のある実施形態において、１つ以上のバイオマーカーは、本発明の方法と関連して使用される。本明細書で使用される場合、「１つ以上のバイオマーカー」は、バイオマーカーの開示されたリストにおける少なくとも１つのバイオマーカーがアッセイされることを意味することが意図され、種々の実施形態において、リストに示される１つより多くのバイオマーカーがアッセイされてもよく、例えば、リスト中のバイオマーカーの２個、３個、４個、５個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、５０個より多く、またはすべてがアッセイされてもよい。

【０１７１】

「マーカー」は遺伝子であり、正常または健常な組織または細胞におけるその発現レベルからの組織または細胞におけるその遺伝子の発現レベルの変化が、代謝性障害などの疾患状態と関連している。「マーカー核酸」は、本発明のマーカーによってコードされるか、またはそれに対応する核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ）である。このようなマーカー核酸には、任意の配列番号（ヌクレオチド）の全体配列または部分配列またはこのような配列の相補物を含むＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）が含まれる。マーカー核酸は、任意の配列番号（ヌクレオチド）の全体配列または部分配列またはこのような配列の相補物を含むＲＮＡもまた含み、ここでは、すべてのチミジン残基がウリジン残基に置き換えられている。「マーカータンパク質」は、本発明のマーカーによってコードされるかまたはそれに対応するタンパク質である。マーカータンパク質は、配列番号（アミノ酸）のいずれかの全体配列または部分配列を含む。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、交換可能に使用される。

【０１７２】

「アポトーシスと関連するマーカー」は、アポトーシス経路に関与するマーカーである。例えば、アポトーシスに関与するマーカーには、表６Ａ、６Ｂ、７～９、２５、および２８において列挙されているマーカーが含まれるがこれらに限定されない。具体的には、アポトーシスに関連するマーカーには、Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｂｃｌ－ｘＳ、ＢＮＩＰ－２、Ｂｃｌ－２、Ｂｉｒｃ６、Ｂｃｌ－２－Ｌ１１（Ｂｉｍ）、ＸＩＡＰ、ＢＲＡＦ、Ｂａｘ、ｃ－Ｊｕｎ、Ｂｍｆ、ＰＵＭＡ、およびｃＭｙｃが含まれる。

【０１７３】

「酸化ストレスと関連するマーカー」は、酸化ストレス経路に関与するマーカーである。例えば、「酸化ストレスと関連するマーカー」には、表１０～１２に列挙されるマーカーが含まれるがこれらに限定されない。具体的には、酸化ストレスに関連するマーカーに

は、好中球サイトゾル因子２、一酸化窒素シンターゼ２Ａ、およびスーパーオキシドディスムターゼ２（ミトコンドリア）が含まれる。

【０１７４】

「熱ショックと関連するマーカー」は、熱ショックに関与するマーカーである。例えば、熱ショックと関連するマーカーには、表１３において列挙されるマーカーが含まれるがこれらに限定されない。

【０１７５】

「血管形成と関連するマーカー」は、血管形成経路に関与するマーカーである。例えば、血管形成と関与するマーカーには、表２４および２７に列挙されるマーカーが含まれるがこれらに限定されない。

【０１７６】

「糖尿病に関連するマーカー」は、糖尿病に関与するマーカーである。例えば、糖尿病に関連するマーカーは、表１４～１７、２３、および２６に列挙されるマーカーが含まれるがこれらに限定されない。

【０１７７】

「代謝性障害関連」体液は、患者の身体中にあるとき、代謝細胞と接触するかもしくはそれを横切り、または代謝細胞から抜け落ちた細胞もしくはタンパク質が通過できる流体である。例示的な代謝性障害関連体液には、血液（例えば、全血、血清、血小板が除かれた血液）が含まれ、以下により詳細に記載される。特に、細胞が転移性のとき、多くの代謝性障害関連体液が、その中に代謝性細胞を有することができる。代謝性細胞を含むことができる、細胞含有流体には、全血、血小板が除かれた血液、リンパ液、および尿が含まれるがこれらに限定されない。

【０１７８】

マーカーの発現の「正常」レベルは、代謝性障害に罹患していないヒト被験体または患者の細胞中でのマーカーの発現レベルである。

【０１７９】

マーカーの「過剰発現」または「高レベルの発現」とは、発現を評価するために利用されるアッセイの標準誤差より大きな試験試料中の発現レベルをいい、対照試料（例えば、マーカー関連疾患を、すなわち、代謝性障害を有さない健常被験体からの試料）中のマーカーの発現レベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルの好ましくは少なくとも２倍、より好ましくは３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、または１０倍である。

【０１８０】

マーカーの「より低いレベルの発現」とは、対照試料（例えば、マーカー関連疾患、すなわち、代謝性障害を有さない健常被験体からの試料）中のマーカーの発現レベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルよりも少なくとも２倍、より好ましくは３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、または１０倍低い試験試料中の発現レベルをいう。

【０１８１】

「転写されたポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」は、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｃＤＮＡ、またはこのようなＲＮＡもしくはｃＤＮＡのアナログ）であり、これは、本発明のマーカーの転写、ならびに、もしあれば、ＲＮＡ転写物および通常の転写後プロセシング（例えば、スプライシング）、およびＲＮＡ転写物の逆転写によって造られた成熟ｍＲＮＡのすべてまたは一部と相補的であるかまたは相同である。

【０１８２】

「相補的」とは、２つの核酸鎖の領域間、または同じ核酸鎖の２つの領域間での配列相補性の広い概念をいう。第１の核酸領域のアデニン残基は、第１の領域に対して逆平行である第２の核酸領域の残基と、その残基がチミンまたはウラシルである場合に、特定の水素結合（「塩基対形成」）が可能であることが知られている。同様に、第１の核酸鎖のシ

トシン残基は、第１の鎖に対して逆平行である第２の核酸鎖の残基と、その残基がグアニンである場合に、塩基対形成が可能であることが知られている。２つの核酸が逆平行様式で配置され、第１の領域の少なくとも１個のヌクレオチド残基が第２の領域の残基と塩基対形成可能である場合に、核酸の第１の領域は同じかまたは異なる核酸の第２の領域に相補的である。好ましくは、第１の領域は第１の部分を含み、第２の領域は第２の部分を含み、それによって、第１の部分および第２の部分は逆平行様式に配置され、第１の部分の少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約７５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％のヌクレオチド残基が、第２の部分におけるヌクレオチド残基と塩基対形成が可能である。より好ましくは、第１の部分のすべてのヌクレオチド残基は、第２の部分のヌクレオチド残基と塩基対形成が可能である。

【０１８３】

「相同的」とは、本明細書で使用される場合、同じ核酸鎖の２つの領域間、または２つの異なる核酸鎖の領域間でのヌクレオチド配列類似性をいう。両方の領域中のヌクレオチド残基の位置が同じヌクレオチド残基によって占められるとき、これらの領域はその位置において相同である。各領域の少なくとも１つのヌクレオチド残基位置が同じ残基によって占められる場合、第１の領域は第２の領域に対して相同である。２つの領域間の相同性は、同じヌクレオチド残基によって占められる２つの領域のヌクレオチド残基の位置の割合によって表現される。例として、ヌクレオチド配列５’－ＡＴＴＧＣＣ－３’を有する領域およびヌクレオチド配列５’－ＴＡＴＧＧＣ－３’を有する領域は５０％相同性を共有する。好ましくは、第１の領域は第１の部分を有し、第２の領域は第２の部分を有し、それによって、各々の部分のヌクレオチド残基位置の少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約７５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％が同じヌクレオチド残基によって占められる。より好ましくは、各々の部分のすべてのヌクレオチド残基位置が同じヌクレオチド残基によって占められる。

【０１８４】

「本発明のタンパク質」は、マーカータンパク質およびそれらのフラグメント、改変体マーカータンパク質およびそれらのフラグメント、マーカーまたは改変体マーカータンパク質の少なくとも１５アミノ酸セグメントを含むペプチドおよびポリペプチド、ならびにマーカーもしくは改変体マーカータンパク質、またはマーカーまたは改変体マーカータンパク質の少なくとも１５アミノ酸セグメントを含む融合タンパク質を包含する。

【０１８５】

本発明はさらに、本発明のマーカータンパク質およびマーカータンパク質のフラグメントと特異的に結合する、抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントを提供する。本明細書中で他に特定されない限り、「抗体」という用語は、天然に存在する型の抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ）、ならびに単鎖抗体、キメラおよびヒト化抗体、多特異的抗体などの組換え抗体、ならびにフラグメントおよび誘導体が少なくとも抗原結合部位を有する前述のすべてのフラグメントおよび誘導体を広範に包含する。抗体誘導体は、抗体に結合体化されたタンパク質または化学部分を含んでもよい。

【０１８６】

ある実施形態において、バイオマーカーはインスリン受容体経路の調節因子である。ある実施形態において、バイオマーカーはインスリン受容体に結合する。ある実施形態において、バイオマーカーは糖尿病関連遺伝子である。糖尿病関連遺伝子には、例えば、表２３に列挙される遺伝子が含まれる。ある実施形態において、バイオマーカーは酸化ストレスに関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは、カスパーゼ調節因子、例えば、カスパーゼ活性化因子またはカスパーゼインヒビターである。ある実施形態において、バイオマーカーは細胞増殖に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは、細胞周期調節およびＤＮＡ合成に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーは、解糖および代謝、例えば、ペントースリン酸経路およびミトコンドリア酸化代謝に関与する。さらなる実施形態において、バイオマーカーは分子輸送に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは細胞シグナル伝達に関与する。他の実施形態において、バイオ

マーカーは、糖尿病および酸化ストレス、例えば、解糖経路およびインスリン処理に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーは１４－３－３媒介シグナル伝達に関与する。さらなる実施形態において、バイオマーカーは、セラミドシグナル伝達に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーはミトコンドリアタンパク質輸送に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは脂肪細胞分化に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーは脂質およびコレステロール代謝に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは膜流動性に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは免疫調節に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーはゲノム安定性に関与する。さらなる実施形態において、バイオマーカーは細胞外マトリックスタンパク質完全性に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは膜輸送に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは酸化制御に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーはペントースリン酸経路に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーである。ある実施形態において、バイオマーカーはアラキドン酸代謝に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは本明細書中上記に示された経路の２つ以上に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは本明細書中上記に示された経路の３つ以上、４つ以上、５つ以上などに関与するある実施形態において、１つより多くのバイオマーカーが、本発明に関連して利用される。これらの実施形態において、バイオマーカーは、各々個別に、本明細書中上記に示された経路の１つ以上、２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上などに関与する。

【０１８７】

ある実施形態において、特定の挙げられた遺伝子が、処置後の異なる期間または各種の濃度の潜在的な環境影響因子（例えばＣｏＱ１０）による処置などの、１を超える処置条件に関連している場合、その特定の遺伝子の倍率変化は最長記録処置時間を指す。他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、最短記録処置時間を指す。他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、ｅｎｖ影響因子（例えばＣｏＱ１０）の最高濃度による処置を指す。他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、ｅｎｖ影響因子（例えばＣｏＱ１０）の最低濃度による処置を指す。また他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、ｅｎｖ影響因子の治療効果と一致する方式における調節（例えば上方または下方調節）を指す。

【０１８８】

特定の実施形態において、正または負の倍率変化とは、表２～４および６～２９および６４～６９のいずれかに列挙される、任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態において、正または負の倍率変化とは、表２～４および６～２９および６４～６９のいずれかに列挙されるが、１個の表が除外される（例えば、表１以外、表５以外など）、任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態において、正または負の倍率変化とは、表２～４および６～２９および６４～６９のいずれかに列挙されるが、任意の２個の表が除外される（例えば、表１および５以外、表２および１６以外など）、任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態において、正または負の倍率変化とは、表２～４および６～２９および６４～６９のいずれかに列挙されるが、任意の３個の表が除外されるか、または任意の４個の表が除外されるか、または任意の５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはそれ以上の表が除外される、任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態において、正または負の倍率変化とは、表２～４および６～２９および６４～６９のいずれかに列挙されるが、表１、５、９、１２、および５９が除外される、任意の遺伝子の変化をいう。

【０１８９】

本明細書で使用する場合、「正の倍率変化」は、関連する表に挙げられた遺伝子の「上方調節」または「（発現の）上昇」を指す。

【０１９０】

本明細書で使用する場合、「負の倍率変化」は、関連する表に挙げられた遺伝子の「下方調節」または「（発現の）低下」を指す。

【０１９１】

本発明の種々の態様は以下のサブセクションにおいてさらに詳細に説明される。

【０１９２】

１．単離された核酸分子

本発明の１つの態様は、マーカータンパク質またはその一部をコードする核酸を含む単離された核酸分子に関する。本発明の単離された核酸には、マーカー核酸分子を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用のために十分な核酸分子、およびマーカー核酸分子のフラグメント、例えば、マーカー核酸分子の増幅または変異のためのＰＣＲプライマーとしての使用のために適切なものもまた含まれる。本明細書で使用される場合、「核酸分子」という用語は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）およびＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）およびヌクレオチドアナログを使用して生成されたＤＮＡまたはＲＮＡのアナログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【０１９３】

「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されているものである。１つの実施形態において、「単離された」核酸分子は、その核酸が由来する生物のゲノムＤＮＡ中の核酸（すわわち、核酸の５‘および３’末端に位置する配列）に天然に隣接する配列（好ましくは、タンパク質コード配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離された核酸分子は、その核酸が由来する細胞のゲノムＤＮＡ中の核酸分子に天然に隣接するヌクレオチド配列の約５ｋＢ、４ｋＢ、３ｋＢ、２ｋＢ、１ｋＢ、０．５ｋＢｏｒ０．１ｋＢ未満を含むことができる。別の実施形態において、「単離された」核酸分子、例えば、ｃＤＮＡ分子は、組換え技術によって産生されたときには他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まず、または化学合成された場合には、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことがあり得る。細胞物質を実質的に含まない核酸分子には、約３０％、２０％、１０％、または５％未満の異種核酸（本明細書では「夾雑核酸」とも呼ばれる）を有する調製物が含まれる。

【０１９４】

本発明の核酸分子は、標準的な分子生物学的技術および本明細書に記載されるデータベース記録における配列情報を使用して単離できる。このような核酸配列のすべてまたは一部を使用して、本発明の核酸分子は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニングの技術を使用して（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．編．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９に記載されているように）単離できる。

【０１９５】

本発明の核酸分子は、標準的なＰＣＲ増幅技術に従って、鋳型としてｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡを、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅できる。そのように増幅された核酸は、適切なベクターにクローニングされ、ＤＮＡ配列決定分析によって特徴付けできる。さらに、本発明の核酸分子のすべてまたは一部に対応するヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動ＤＮＡ合成装置を使用して調製できる。

【０１９６】

別の好ましい実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、マーカー核酸のヌクレオチド配列またはマーカータンパク質をコードする核酸のヌクレオチド配列に相補的な核酸配列を有する核酸分子を含む。所定のヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、所定のヌクレオチド配列に十分に相補的であるものであって、この分子は所定のヌクレオチド配列にハイブリダイズでき、それによって安定な二重鎖を形成する。

【０１９７】

さらに、本発明の核酸分子は、核酸配列の一部のみを含むことができ、ここで、全長核酸配列はマーカー核酸を含み、またはこれはマーカータンパク質をコードする。このような核酸は、例えば、プローブまたはプライマーとして使用できる。プローブ／プライマー

は、典型的には、１つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして使用される。このオリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、本発明の核酸の少なくとも約７、好ましくは約１５、より好ましくは約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２５０、３００、３５０、または４００以上の連続するヌクレオチドにハイブリダイズする核酸配列の領域を含む。

【０１９８】

本発明の核酸分子の配列に基づくプローブは、本発明の１つ以上のマーカーに対応する転写物またはゲノム配列を検出するために使用できる。プローブは、そこに結合される標識基、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素コファクターを含む。例えば、被験体からの細胞の試料中のタンパク質をコードする核酸分子のレベルを測定することによって、例えば、ｍＲＮＡレベルを検出するかまたはタンパク質をコードしている遺伝子が変異されたかもしくは欠失されたかを決定することによって、このようなプローブは、誤ってタンパク質を発現する細胞または組織を同定するための診断検査キットの一部として使用できる。

【０１９９】

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、マーカータンパク質（例えば、配列番号（アミノ酸）の配列を有するタンパク質）をコードしている核酸のヌクレオチド配列と異なり、したがって、同じタンパク質をコードする核酸分子を包含する。

【０２００】

アミノ酸配列の変化に導くＤＮＡ配列多型が集団（例えば、ヒト集団）内に存在できることが当業者によって理解される。このような遺伝子多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内で個体の間で存在できる。対立遺伝子は、所定の遺伝子座において交互に存在する遺伝子の群の１つである。加えて、ＲＮＡ発現レベルに影響を与えるＤＮＡ多型が存在し、これは、（例えば、調節または分解に影響を与えることによって）遺伝子の全体的な発現レベルに影響を与え得ることが理解される。

【０２０１】

本明細書で使用される場合、「対立遺伝子変異」という語句は、所定の遺伝子座において、またはヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドに起こるヌクレオチド配列をいう。

【０２０２】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」および「組換え遺伝子」という用語は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子バリエーションは、典型的には、所定の遺伝子におけるヌクレオチド配列の１～５％の変異を生じる。代替的な対立遺伝子は、多数の異なる個体の中で、目的の遺伝子を配列決定することによって同定できる。これは、さまざまな個体における同じ遺伝子座を同定するためにハイブリダイゼーションプローブを使用することによって容易に実行できる。任意のおよびすべてのこのようなヌクレオチドのバリエーション、ならびに天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、機能的活性を変化しない、得られるアミノ酸多型またはバリエーションは、本発明の範囲内にあることが意図される。

【０２０３】

別の実施形態において、単離された核酸分子は、少なくとも７、１５、２０、２５、３０、４０、６０、８０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５５０、６５０、７００、８００、９００、１０００、１２００、１４００、１６００、１８００、２０００、２２００、２４００、２６００、２８００、３０００、３５００、４０００、４５００、またはそれ以上のヌクレオチド長であり、ストリンジェントな条件下で、マーカー核酸またはマーカータンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、少なくとも６０％（６５％、７０％、好ましくは７５％）互いに同一であるヌクレオチド配列が通常互いにハイブリダイズしたままであるハイブリダイゼーション

および洗浄のための条件を説明することが意図される。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）のセクション６．３．１～６．３．６において見い出すことができる。好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、約４５℃の６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）、続いて５０～６５℃での０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回以上の洗浄である。

【０２０４】

集団中に存在し得る本発明の核酸分子の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列の変化が変異によって導入でき、それによってコードされるタンパク質の生物学的活性を変化させることなく、コードされるタンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらすことをさらに認識する。例えば、「非必須」アミノ酸残基においてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換を作製できる。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変化させることなく、野生型配列から変化できる残基であるのに対し、「必須」アミノ酸は生物学的活性のために必要とされる。例えば、様々な種のホモログの間で保存されていないかまたは単に半保存性であるアミノ酸残基は活性については必須でないかもしれず、したがって、変化のための標的であり得る。あるいは、様々な種（例えば、マウスまたはヒト）のホモログの間で保存されているアミノ酸残基は活性については必須であるかもしれず、したがって、変化のための標的になりそうでない。

【０２０５】

したがって、本発明の別の態様は、活性について必須でないアミノ酸残基の変化を含む改変体マーカータンパク質をコードする核酸分子に関する。このような改変体マーカータンパク質は、天然に存在するマーカータンパク質とはアミノ酸配列において異なっているが、なお生物学的活性を保持している。１つの実施形態において、このような改変体マーカータンパク質は、マーカータンパク質のアミノ酸配列に少なくとも約４０％同一、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有する。

【０２０６】

１つ以上のアミノ酸残基の置換、付加、または欠失が、コードされたタンパク質に導入されるように、改変体マーカータンパク質をコードする単離された核酸分子は、１つ以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失をマーカー核酸のヌクレオチド配列に導入することによって作製できる。変異は、部位特異的変異誘発およびＰＣＲ媒介変異誘発などの標準的な技術によって導入できる。好ましくは、保存性アミノ酸置換は、１つ以上の推定の非必須アミノ酸残基において作製される。「保存性アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野において規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するもの（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するもの（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するもの（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖を有するもの（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するもの（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。代替として、変異は、例えば、飽和変異誘発によってコード配列のすべてまたは一部に沿ってランダムに導入でき、得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するために生物学的活性についてスクリーニングできる。変異誘発後、コードされたタンパク質は、組換え的に発現でき、タンパク質の活性が決定できる。

【０２０７】

本発明は、アンチセンス核酸分子、すなわち、本発明のセンス核酸に相補的である分子を包含し、これは例えば、二本鎖マーカーｃＤＮＡ分子のコード鎖に相補的であり、また

はマーカーｍＲＮＡ配列に相補的である。したがって、本発明のアンチセンス核酸は、本発明のセンス核酸に水素結合（すなわち、アニーリング）できる。アンチセンス核酸は、全体のコード鎖またはその一部のみに、例えば、タンパク質のコード領域（またはオープンリーディングフレーム）のすべてまたは一部に相補的であり得る。アンチセンス核酸分子はまた、マーカータンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域のすべてまたは一部に対してアンチセンスでもあり得る。非コード領域（「５’および３’非翻訳領域」）は、コード領域に隣接し、アミノ酸に翻訳されない５’および３’配列である。

【０２０８】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０以上のヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当分野で公知の手順を使用する化学合成および酵素ライゲーション反応を使用して作製することができる。例えばアンチセンス核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然型ヌクレオチドまたは分子の生物安定性を向上させるまたはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成された２本鎖の物理的安定性を向上させるように設計された多様に修飾されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成することができ、例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸を生成するために使用できる修飾ヌクレオチドの例には、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルクエオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルクエオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリンが含まれる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローンされている発現ベクターを使用して、生物学的に産生できる（すなわち、挿入された核酸から転写されたＲＮＡは、以下のサブセクションにおいてさらに説明される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である）。

【０２０９】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果、これらがマーカータンパク質をコードする細胞ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズし、またはそれらと結合し、それによって、例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって、マーカーの発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するために従来的なヌクレオチド相補性によってであり得、または、例えば、ＤＮＡ二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重ヘリックスの大きな溝における特異的相互作用を通してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例は、組織部位における直接注射または代謝性障害関連の体液へのアンチセンス核酸の注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的とするために修飾でき、次いで、全身投与できる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、これらが、例えば、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体にアンチセンス核酸分子を連結することによって、選択された細胞表面上で発現される受容体または抗原に特異的に結合するように修飾できる。ア

ンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載されるベクターを使用しても細胞に送達できる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なｐｏｌＩＩまたはｐｏｌＩＩＩプロモーターの制御下に配置されているベクター構築物が好ましい。

【０２１０】

本発明のアンチセンス核酸分子は、αアノマー型核酸分子であり得る。ａ－アノマー核酸分子は、通常のａ－ユニットとは反対に、鎖が相互に平行に並んだ、相補的ＲＮＡとの特異的な２本鎖ハイブリッドを形成する（Ｇａｕｌｔｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１５：６６２５－６６４１）。アンチセンス核酸分子はまた、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド（Ｉｎｏｕｅ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１５：６１３１～６１４８）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログを含むことができる（Ｉｎｏｕｅ ｅｔ ａｌ．，１９８７，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２１５：３２７－３３０）。

本発明はリボザイムもまた包含する。リボザイムは、一本鎖核酸、例えば、リボザイムが相補性領域を有するｍＲＮＡを切断可能なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡ分子である。したがって、リボザイム（例えば、Ｈａｓｅｌｈｏｆｆ ａｎｄ Ｇｅｒｌａｃｈ，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５８５～５９１に記載されるようなハンマーヘッドリボザイム）は、ｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断するために使用でき、それによって、ｍＲＮＡによってコードされているタンパク質の翻訳を阻害する。マーカータンパク質をコードしている核酸分子についての特異性を有するリボザイムは、マーカーに対応するｃＤＮＡのヌクレオチド配列に基づいて設計できる。例えば、テトラヒメナＬ－１９ ＩＶＳ ＲＮＡの誘導体が構築でき、ここでは、活性部位のヌクレオチド配列が、切断されるヌクレオチド配列に相補的である（Ｃｅｃｈ ｅｔ ａｌ．米国特許第４，９８７，０７１号；およびＣｅｃｈ ｅｔ ａｌ．米国特許第５，１１６，７４２号を参照のこと）。あるいは、本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡは、ＲＮＡ分子のプールから特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡを選択するために使用できる（例えば、Ｂａｒｔｅｌ ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ，１９９３，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１４１１～１４１８を参照のこと）。

【０２１１】

本発明は、三重ヘリックス構造を形成する核酸分子もまた包含する。例えば、本発明のマーカーの発現は、マーカー核酸またはタンパク質をコードする遺伝子の調節領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的として、標的細胞中の遺伝子の転写を妨害するための三重ヘリックス構造を形成することによって阻害できる。一般的には、Ｈｅｌｅｎｅ（１９９１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．６（６）：５６９～８４；Ｈｅｌｅｎｅ（１９９２） Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７～３６；およびＭａｈｅｒ（１９９２）Ｂｉｏａｓｓａｙｓ １４（１２）：８０７～１５を参照のこと。

【０２１２】

種々の実施形態において、本発明の核酸分子は、塩基部分、糖部分、またはリン酸バックボーンにおいて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善するために修飾できる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸バックボーンは、ペプチド核酸を生成するために修飾できる（Ｈｙｒｕｐ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ＆Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４（１）：５－２３に概説されている）。を参照のこと）。本明細書で使用される場合、「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」という用語は、核酸模倣物、例えば、ＤＮＡ模倣物であり、ここでは、デオキシリボースリン酸バックボーンが擬ペプチドバックボーンによって置き換えられており、４種の天然の核酸塩基のみが保持されている。ＰＮＡの天然バックボーンは、低イオン強度の条件下で、ＤＮＡおよびＲＮＡへの特異的ハイブリダイゼーションを許容することが示されてきた。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Ｈｙｒｕｐ ｅｔ ａｌ．（１９９６），ｓｕｐｒａ；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．

Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１４６７０－６７５）に記載の標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施することができる。

【０２１３】

ＰＮＡは、治療的および診断的適用において使用できる。例えば、ＰＮＡは、例えば、転写もしくは翻訳の停止または複製の阻害を誘導することによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたはアンチ遺伝子剤として使用できる。ＰＮＡはまた、例えば、遺伝子中の単一の塩基対変異の分析において、例えば、ＰＮＡ指向性ＰＣＲクランピングによって、他の酵素、例えば、Ｓ１ヌクレアーゼと組み合わせて使用されるときの人工制限酵素として（Ｈｙｒｕｐ（１９９６）、前出）；またはＤＮＡ配列決定およびハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして（Ｈｙｒｕｐ，１９９６、前出；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１４６７０－６７５）。

別の実施形態において、ＰＮＡは、例えば、それらの安定性または細胞の取り込みを増強するために、親油性または他のヘルパー基をＰＮＡに加えることによって、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの形成によって、またはリポソームの使用もしくは当該分野において公知である薬物送達の他の技術によって修飾できる。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を合わせることができるＰＮＡ－ＤＮＡキメラが生成できる。ＰＮＡ部分が高い結合親和性および特異性を提供しながら、このようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素、例えば、ＲＮａｓｅ　ＨおよびＤＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡ部分と相互作用することを可能にする。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、核酸塩基の間の結合の塩基の積み重ねの数と、配向によって選択される適切な長さのリンカーを使用して連結できる（Ｈｙｒｕｐ、１９９６、前出）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、Ｈｙｒｕｐ（１９９６）、前出およびＦｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２４（１７）：３３５７～６３において記載されるように実施できる。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準的なホスホルアミダイトカップリング化学および修飾ヌクレオシドアナログを使用して、固相支持体上で合成できる。５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホルアミダイトなどの化合物は、ＰＮＡとＤＮＡの５’末端の間の連結として使用できる（Ｍａｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１７：５９７３－８８）．次いで、ＰＮＡモノマーは、５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを有するキメラ分子を産生するために、段階的な様式で結合される（Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２４（１７）：３３５７～６３）。あるいは、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを用いて合成できる（Ｐｅｔｅｒｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９７５，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５：１１１９－１１１２４）。

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞受容体を標的化するため）、または細胞膜（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：６５５３－６５５６；Ｌｅｍａｉｔｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：６４８～６５２；ＰＣＴ公開番号ＷＯ８８／０９８１０を参照のこと）、もしくは血液脳関門（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ８９／１０１３４を参照のこと）を通した輸送を容易にする薬剤などの他の添付された基を含むことができる。加えて、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発性切断因子（例えば、Ｋｒｏｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　６：９５８～９７６を参照のこと）またはインターカレート因子（例えば、Ｚｏｎ，１９８８，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９－５４９）．を参照のこと）を用いて修飾できる。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発性架橋剤、輸送因子、ハイブリダイゼーション誘発性切断剤などに結合体化できる。

【０２１４】

本発明は、分子ビーコンが試料中の本発明の核酸の存在を定量するために有用であるような、本発明の核酸に相補的である少なくとも１つの領域を有する分子ビーコン核酸もま

た含む。「分子ビーコン」核酸は、１対の相補的領域、ならびに蛍光団およびそれに付随する蛍光クエンチャーを有する核酸である。蛍光団およびクエンチャーは、相補性領域が互いにアニールするときに、蛍光団の蛍光がクエンチャーによってクエンチされるような方向で、核酸の様々な部分に付随している。核酸の相補性領域が互いにアニールしないとき、蛍光団の蛍光は、より低い程度にクエンチされる。分子ビーコン核酸は、例えば、米国特許第５，８７６，９３０号に記載されている。

【０２１５】

２．単離されたタンパク質および抗体

本発明の１つの態様は、単離されたマーカータンパク質およびその生物学的に活性な部分、ならびにマーカータンパク質またはそのフラグメントに対して指向される抗体を惹起するための免疫原としての使用のために適切なポリペプチドフラグメントに関する。１つの実施形態において、ネイティブマーカータンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して適切な精製スキームによって、細胞または組織の供給源から単離できる。別の実施形態において、マーカータンパク質の全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドは、組換えＤＮＡ技術によって産生される。組換え発現の代替としては、このようなタンパク質またはペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学合成できる。

【０２１６】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、タンパク質が由来する細胞または組織の供給源からの細胞物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まず、あるいは化学合成の場合には、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。「実質的に細胞物質を含まない」という言葉には、タンパク質がそれが単離された細胞の細胞成分から単離されているかまたは組換え産生されている、タンパク質の調製物が含まれる。したがって、細胞物質を実質的に含まないタンパク質には、約３０％、２０％、１０％、または５％（乾燥重量）未満の異種タンパク質（本明細書では「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を有するタンパク質の調製物が含まれる。タンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え的に産生されるとき、これもまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まず、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の約２０％、１０％、または５％体積未満を表す。タンパク質が化学合成によって産生されるとき、これは、好ましくは、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、すなわち、これは、化学前駆体またはタンパク質の合成に関与する他の化学物質から分離されている。したがって、このようなタンパク質の調製物は、約３０％、２０％、１０％、または５％（乾燥重量）未満の化学前駆体または目的のポリペプチド以外の化合物を有する。

【０２１７】

マーカータンパク質の生物学的に活性な部分には、マーカータンパク質のアミノ酸配列と十分に同一であるかまたはそれに由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれ、これは、全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、対応する全長タンパク質の少なくとも１つの活性を示す。典型的には、生物学的に活性な部分は、対応する全長タンパク質の少なくとも１つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。本発明のマーカータンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、１０、２５、５０、１００またはそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。さらに、マーカータンパク質の他の領域が欠失している、他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製でき、ネイティブ型のマーカータンパク質の機能的活性の１つ以上について評価できる。

【０２１８】

好ましいマーカータンパク質は、任意の配列番号（ヌクレオチド）の配列を含むヌクレオチド配列によってコードされる。他の有用なタンパク質は、これらの配列の１つに実質的に同一であり（例えば、少なくとも約４０％、好ましくは、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一）、対応する天然に存在するマーカータンパク質の機能的活性を保持し、しかし、天然の対立遺伝子バリエーションまたは変異誘発に起因して、アミノ酸配列が異なっている。

【０２１９】
２つのアミノ酸配列または２つの核酸の同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較目的のために整列される（例えば、第２のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのために、第１のアミノ酸または核酸配列にギャップが導入できる）。次いで、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置において、アミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められているとき、これらの分子はその位置において同一である。好ましくは、２つの配列間の同一性パーセントは、全体のアラインメントを使用して計算される。あるいは、２つの配列間の同一性パーセントは、局所的アラインメントを使用して計算される。２つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一である位置の数の関数である（すなわち、同一性％＝同一の位置の数／全体の位置の数（例えば、重複する位置）×１００）。１つの実施形態において、２つの配列は同じ長さである。別の実施形態において、２つの配列は同じ長さではない。

【０２２０】
２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成できる。２つの配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Ｋａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２２６４～２２６８のアルゴリズムであって、これはＫａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：５８７３～５８７７によって改変されている。このようなアルゴリズムは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０のＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＸプログラムに組み込まれている。ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、ＢＬＡＳＴＮプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２を用いて実施できる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、ＢＬＡＳＴＰプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３を用いて実施できる。比較目的のためのギャップ付きアラインメントを得るために、ギャップ付きＢＬＡＳＴと呼ばれるＢＬＡＳＴアルゴリズムのより新しいバージョンが、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９～３４０２に記載されるように利用でき、これは、プログラムＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＰ、およびＢＬＡＳＴＸのためのギャップ付き局所的アラインメントを実施することが可能である。あるいは、ＰＳＩ－Ｂｌａｓｔが、分子間の距離の関係性を検出する繰り返し検索を実施するために使用できる。ＢＬＡＳＴ、ギャップ付きＢＬＡＳＴ、およびＰＳＩ－Ｂｌａｓｔプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、ＢＬＡＳＴＸおよびＢＬＡＳＴＮ）のデフォルトパラメーターが使用できる。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを参照のこと。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Ｍｙｅｒｓ ａｎｄ Ｍｉｌｌｅｒ，（１９８８）ＣＡＢＩＯＳ ４：１１～１７のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、ＧＣＧ配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにＡＬＩＧＮプログラムを利用するとき、ＰＡＭ１２０重み残基表、ギャップ長ペナルティー１２、およびギャップペナルティー４が使用できる。局所的配列類似性およびアラインメントの領域を同定するためのなお別の有用なアルゴリズムは、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４～２４４８に記載されるようなＦＡＳＴＡアルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するためのＦＡＳＴＡアルゴリズムを使用するとき、ＰＡＭ１２０重み残基表は、例えば、ｋ組値２を用いて使用できる。

【０２２１】
２つの配列間の同一性パーセントは、ギャップの許可を伴ってまたは伴わずに、上記のものと同様の技術を使用して決定できる。同一性パーセントを計算する際に、正確な一致

のみが計数される。

【０２２２】

本発明は、マーカータンパク質またはそのフラグメントを含むキメラまたは融合タンパク質もまた提供する。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド（すなわち、マーカータンパク質以外のポリペプチド）に作動可能に連結されたマーカータンパク質のすべてまたはその一部（好ましくは、生物学的に活性な部分）を含む。融合タンパク質の中では、「作動可能に連結される」という用語は、マーカータンパク質またはそのセグメントおよび異種タンパク質が互いにインフレームで融合されていることを示すことが意図される。異種ポリペプチドは、マーカータンパク質またはセグメントのアミノ末端またはカルボキシ末端に融合できる。

【０２２３】

１つの有用な融合タンパク質は、マーカータンパク質またはセグメントがＧＳＴ配列のカルボキシ末端に融合されているＧＳＴ融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、本発明の組換えポリペプチドの精製を容易にできる。

【０２２４】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのアミノ末端において異種シグナル配列を含む。例えば、マーカータンパク質のネイティブシグナル配列は、取り除かれ、別のタンパク質からのシグナル配列で置き換えられることができる。例えば、バキュロウイルスエンベロープタンパク質のｇｐ６７分泌配列は、異種シグナル配列として使用できる（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．編，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ，１９９２）。真核生物異種シグナル配列の他の例には、メリチンおよびヒト胎盤アルカリホスファターゼの分泌配列が含まれる（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ；Ｌａ Ｊｏｌｌａ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）。なお別の例において、有用な真核生物異種シグナル配列には、ｐｈｏＡ分泌シグナル（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，前出）およびプロテインＡ分泌シグナル（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ；Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ）が挙げられる。

【０２２５】

なお別の実施形態において、融合タンパク質は、マーカータンパク質のすべてまたはその一部が免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合されている、免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、リガンド（可溶性または膜結合型）と細胞の表面上のタンパク質（受容体）の間の相互作用を阻害するために、製薬組成物に取り込まれ、被験体に投与され、それによって、インビボでシグナル伝達を抑制することができる。この免疫グロブリン融合タンパク質は、マーカータンパク質のコグネートリガンドの生物学的利用能に影響を与えるために使用できる。リガンド／受容体相互作用の阻害は、増殖および分化の障害を処置することと、細胞生存を調節すること（例えば、促進することまたは阻害すること）の両方のために、治療的に有用であり得る。さらに、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、リガンドを精製するために、およびスクリーニングアッセイにおいては、マーカータンパク質のリガンドとの相互作用を阻害する分子を同定するために、被験体におけるマーカータンパク質に対して指向された抗体を産生するために免疫原として使用できる。

【０２２６】

本発明のキメラおよび融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ技術によって産生できる。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む従来的な技術によって合成できる。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅が、２つの連続する遺伝子フラグメント間の相補的突出を生じるアンカープライマーを使用して実行でき、これらは、続いてアニールされ、再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成する（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，前出を参照のこと）。さらに、すでに融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をコードしている多くの発現ベクターが市販されている。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、融合部分が本発明のポリペプチドに対してインフレームで連結

されるように、このような発現ベクターにクローニングできる。

【０２２７】

シグナル配列は、マーカータンパク質の分泌および単離を容易にするために使用できる。シグナル配列は、１つ以上の切断事象において、分泌の間に成熟タンパク質から一般的に切断される疎水性アミノ酸のコアによって典型的には特徴付けされる。このようなシグナルペプチドは、成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を、これらが分泌経路を通過するときに可能にするプロセシング部位を含む。したがって、本発明は、シグナル配列を有する、マーカータンパク質、融合タンパク質、またはそのセグメントに関し、ならびに、シグナル配列がタンパク質分解的に切断されているこのようなタンパク質（すなわち、切断産物）に関する。１つの実施形態において、シグナル配列をコードする核酸配列は、マーカータンパク質またはそのセグメントなどの目的のタンパク質に発現ベクター中で作動可能に連結できる。シグナル配列は、例えば、真核細胞宿主からのタンパク質の分泌を方向付け、この宿主に、発現ベクターが形質転換され、シグナル配列は、引き続いて、または同時に切断される。次いで、タンパク質は、当該分野において認識されている方法によって、細胞外培地から容易に精製できる。あるいは、シグナル配列は、精製を容易にする配列を使用して、例えば、ＧＳＴドメインを用いて、目的のタンパク質に連結できる。

【０２２８】

本発明はまた、マーカータンパク質の改変体に関する。このような改変体は、アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストのいずれかとして機能できる変化したアミノ酸配列を有する。改変体は、変異誘発、例えば、離散点変異または短縮によって生成できる。、アゴニストは、天然に存在する型のタンパク質の生物学的活性の実質的に同じものまたはそのサブセットを保持できる。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的のタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流のメンバーに競合的に結合することによって、天然に存在する型のタンパク質の活性の１つ以上を阻害できる。したがって、特定の生物学的効果は、限られた機能の改変体を用いる処理によって誘発できる。天然に存在する型のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、天然に存在する型のタンパク質を用いる処置と比較して、被験体におけるより少ない副作用を有し得る。

【０２２９】

アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストのいずれかとして機能するマーカータンパク質の改変体は、変異体、例えば、本発明のタンパク質の短縮変異体のコンビナトリアルライブラリーを、アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定できる。１つの実施形態において、改変体の多様化されたライブラリーは、核酸レベルにおいてコンビナトリアル変異誘発によって生成され、多様化された遺伝子ライブラリーによってコードされている。潜在的なタンパク質配列の縮重セットが、個別のポリペプチドとして、または代替的に、より大きな融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイ用）、発現可能であるように、改変体の多様化されたライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的ライゲーションすることによって産生できる。縮重オリゴヌクレオチド配列からマーカータンパク質の潜在的な改変体のライブラリーを産生するために使用できる種々の方法が存在する。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当該分野において公知である（例えば、Ｎａｒａｎｇ，１９８３，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　３９：３；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９８：１０５６；Ｉｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８３　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１１：４７７）を参照のこと。

【０２３０】

加えて、マーカータンパク質のセグメントのライブラリーは、改変体マーカータンパク質またはそのセグメントのスクリーニングおよび引き続く選択のためのポリペプチドの多様化された集団を生成するために使用できる。例えば、コード配列フラグメントのライブラリーは、ニックが分子あたり約１個存在する条件下で、目的のコード配列の二本鎖ＰＣ

Ｒフラグメントをヌクレアーゼで処理すること、その二本鎖ＤＮＡを変性すること、様々なニックを有する生成物からセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成するためにＤＮＡを再生させること、Ｓ１ヌクレアーゼを用いる処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除外すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクターにライゲーションすることによって生成できる。この方法によって、種々のサイズの目的のタンパク質のアミノ末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが誘導できる。

【０２３１】

点変異または短縮によって造られたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、および選択された特性を有する遺伝子産物についてのｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が、当該分野において公知である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高スループット分析に適している最も広く使用されている技術には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および所望の活性の検出が、産物が検出される遺伝子をコードしているベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現することが挙げられる。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増強する技術である再帰アンサンブル変異誘発（ＲＥＭ）は、本発明のタンパク質の改変体を同定するために、スクリーニングアッセイと組み合わせて使用できる（Ａｒｋｉｎ ａｎｄ Ｙｏｕｒｖａｎ，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９：７８１１～７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ６（３）：３２７～３３１）。

【０２３２】

本発明の別の態様は、本発明のタンパク質に対して指向される抗体に関する。好ましい実施形態において、抗体は、マーカータンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する。本発明で交換可能に使用される「抗体」および「抗体群」という用語は、免疫グロブリン分子ならびに免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を含むそのフラグメントおよび誘導体をいう（すなわち、このような部分は、マーカータンパク質、例えば、マーカータンパク質のエピトープなどの抗原を特異的に結合する抗原結合部位を含む）。本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体は、タンパク質を結合するが、試料、例えば、天然にタンパク質を含む生物試料中の他の分子は実質的に結合しない抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例には、単鎖抗体（ｓｃＡｂ）、Ｆ（ａｂ）およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが含まれるがこれらに限定されない。

【０２３３】

本発明の単離されたタンパク質またはそのフラグメントは、抗体を生成するための免疫原として使用できる。全長タンパク質が使用でき、または代替的には、本発明は、免疫原としての使用のための抗原性ペプチドを提供する。本発明のタンパク質の抗原性ペプチドは、本発明のタンパク質の１つのアミノ酸配列の少なくとも８（好ましくは、１０、１５、２０、または３０以上の）アミノ酸残基を含み、ペプチドに対して惹起された抗体がそのタンパク質と特異的免疫複合体を形成するように、タンパク質の少なくとも１つのエピトープを包含する。抗原性ペプチドによって包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面、例えば、疎水性領域に位置する領域である。疎水性配列分析、親水性配列分析、または同様の分析は、親水性領域を同定するために使用できる。好ましい実施形態において、単離されたマーカータンパク質またはそのフラグメントは免疫原として使用される。

【０２３４】

免疫原は、典型的には、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物または脊椎動物などの適切な（すなわち、免疫適格）対象を免疫することによって抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え的に発現されるかまたは化学合成されたタンパク質またはペプチドを含むことができる。この調製物は、フロイント完全または不完全アジュバントまたは同様の免疫刺激剤などのアジュバントをさらに含むことがで

きる。好ましい免疫原組成物は、例えば、本発明のタンパク質の組換え発現のために非ヒト宿主細胞を使用して作製された免疫原組成物などの他のヒトタンパク質を含まないものである。このような様式で、得られる抗体組成物は、本発明のタンパク質以外のヒトタンパク質の結合が減少しているか、またはその結合がない。

【０２３５】

本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、特定のエピトープと免疫反応することが可能である１つのみの種の抗原結合部位を含む抗体分子の集団をいう。好ましいポリクローナルおよびモノクローナル組成物は、本発明のタンパク質に対して指向される抗体について選択されているものである。特に好ましいポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製物は、マーカータンパク質またはそのフラグメントに対して指向されている抗体のみを含むものである。

【０２３６】

ポリクローナル抗体は、免疫原として本発明のタンパク質を用いて適切な被験体を免疫することによって調製できる。免疫された被験体における抗体力価は、固定化ポリペプチドを使用する酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を用いるなどの標準的な技術によって経時的に監視できる。免疫後の適切な時点において、例えば、特定の抗体力価が最高であるとき、抗体産生細胞が被験体から得られ、標準的な技術、例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５～４９７によってもともと記載されたハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ４：７２を参照のこと）、ＥＢＶ－ハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，７７～９６頁、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ所収、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８５を参照のこと）、またはトリオーマ技術によってモノクローナル抗体（ｍＡｂ）を調製するために使用できる。ハイブリドーマを産生するための技術は周知である（一般的には、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．編，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９４を参照のこと）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なＥＬＩＳＡアッセイを使用して、目的のポリペプチドを結合する抗体について、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出される。

【０２３７】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製することの代替として、本発明のタンパク質に対して指向されるモノクローナル抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）を目的のポリペプチドを用いてスクリーニングすることによって同定および単離できる。ファージディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするためのキットは市販されている（例えば、ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｓｙｓｔｅｍ，カタログ番号２７－９４００－０１；およびｔｈｅ Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ＳｕｒｆＺＡＰ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ Ｋｉｔ，カタログ番号２４０６１２）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングする際の使用のために特に適格である方法および試薬の例は、例えば、米国特許第５，２２３，４０９号；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／１８６１９；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９１／１７２７１；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／２０７９１；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／１５６７９；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９３／０１２８８；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／０１０４７；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／０９６９０；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９０／０２８０９；Ｆｕｃｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７０～１３７２；Ｈａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ３：８１～８５；Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５～１２８１；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ．１２：７２５～７３４に

見い出すことができる。

【０２３８】

本発明は、本発明のタンパク質を特異的に結合する組換え抗体もまた提供する。好ましい実施形態において、組換え抗体は、マーカータンパク質またはそのフラグメントを特異的に結合する。組換え抗体には、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体、単鎖抗体、ならびに多特異的抗体が挙げられるがこれらに限定されない。キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種から誘導されている分子、例えば、マウスｍＡｂから誘導された可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものである。（例えば、Ｃａｂｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第４，８１６，５６７号；およびＢｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，同第４，８１６，３９７号を参照のこと、これらは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）単鎖抗体は１つの抗原結合部位を有し、単一のポリペプチドからなる。これらは、当該分野において公知の技術、例えば、Ｌａｄｎｅｒ　ｅｔ．ａｌ米国特許第４，９４６，７７８号（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）；Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３～４２６；Ｗｈｉｔｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２：１～９；Ｗｈｉｔｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２：９７～１０５；およびＨｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｓｉｇｎ　ａｎｄ　Ｍｏｄｅｌｉｎｇ：Ｃｏｎｃｅｐｔｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　２０３：４６～８８に記載されている方法を使用して製造できる。多特異的抗体は、異なる抗原に特異的に結合する少なくとも２つの抗原結合部位を有する抗体分子である。このような分子は、当該分野において公知の技術、例えば、Ｓｅｇａｌ，米国特許第４，６７６，９８０号（この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）；Ｈｏｌｌｉｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９３）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４～６４４８；Ｗｈｉｔｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．７：１０１７～１０２６および米国特許第６，１２１，４２４号に記載されている方法を使用して製造できる。

【０２３９】

ヒト化抗体は、非ヒト種からの１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する、非ヒト種からの抗体分子である（例えば、Ｑｕｅｅｎ，米国特許第５，５８５，０８９号を参照のこと、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ヒト化モノクローナル抗体は、当該分野において公知である組換えＤＮＡ技術によって、例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ８７／０２６７１；欧州特許出願１８４，１８７；欧州特許出願１７１，４９６；欧州特許出願１７３，４９４；ＰＣＴ公開番号ＷＯ８６／０１５３３；米国特許第４，８１６，５６７号；欧州特許出願１２５，０２３；Ｂｅｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１０４１～１０４３；Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：３４３９～３４４３；Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：３５２１～３５２６；Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：２１４～２１８；Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４７：９９９～１００５；Ｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ　３１４：４４６～４４９；およびＳｈａｗ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８０：１５５３～１５５９）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２～１２０７；Ｏｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４；米国特許第５，２２５，５３９号；Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５５２～５２５；Ｖｅｒｈｏｅｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４；およびＢｅｉｄｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：４０５３～４０６０に記載されている方法を使用して製造できる。

【０２４０】

より特定には、ヒト化抗体は、例えば、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することは不可能であるが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを使用して製造できる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えば、本発明のマーカーに対応するポリペプチドのすべてまたは一部を用いて、通常の様式で免疫される。抗原に対して指向されるモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスによって保持されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、Ｂ細胞分化の間に再配列され、続いて、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。したがって、このような技術を使用すると、治療的に有用なＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＥ抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概説のために、以下を参照のこと：Ｌｏｎｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｈｕｓｚａｒ（１９９５）Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３）．ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を製造するためのこの技術、ならびにこのような抗体を産生するためのプロトコルのより詳細な議論については、例えば、米国特許第５，６２５，１２６号；米国特許第５，６３３，４２５号；米国特許第５，５６９，８２５号；米国特許第５，６６１，０１６号；および米国特許第号５，５４５，８０６号を参照のこと。加えて、Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，ＣＡ）などの企業は、上記に記載されたものと類似の技術を使用して、選択された抗原に対して指向されたヒト抗体を提供することに従事できる。

【０２４１】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド選択」と呼ばれる技術を使用して生成できる。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体は、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドするために使用される（Ｊｅｓｐｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１２：８９９～９０３）。

【０２４２】

本発明の抗体は、産生（例えば、被験体の血液または血清から）または合成の後で単離でき、または周知の技術によってさらに精製できる。例えば、ＩｇＧ抗体は、プロテインＡクロマトグラフィーを使用して精製できる。本発明のタンパク質に特異的な抗体は、選択でき（例えば、部分精製でき）、または、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによって精製できる。例えば、組換え発現され、精製された（または部分精製された）本発明のタンパク質は、上記のように産生され、例えば、クロマトグラフィーカラムなどの固体支持体に共有結合的または非共有結合的に結合される。次いで、カラムは、非常の多くの異なるエピトープに対して指向された抗体を含む試料からの本発明のタンパク質に特異的な抗体をアフィニティー精製するために使用でき、それによって、実質的に精製された抗体組成物、すなわち、夾雑する抗体を実質的に含まないものを生成する。この状況において、実質的に精製された抗体組成物によって、抗体試料が、本発明の所望のタンパク質のエピトープ以外のエピトープに対して指向される夾雑抗体の最大で３０％（乾燥重量）のみを含み、好ましくは、試料の最大で２０％、なおより好ましくは最大で１０％、および最も好ましくは、最大で５％（乾燥重量）が夾雑抗体であることが意味される。精製された抗体組成物とは、組成物中の少なくとも９９％の抗体が本発明の所望のタンパク質に対して指向されることを意味する。

【０２４３】

好ましい実施形態において、本発明の実質的に精製された抗体は、シグナルペプチド、分泌配列、細胞外ドメイン、本発明のタンパク質の膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインまたは細胞膜に特異的に結合してもよい。特に好ましい実施形態において、本発明の実質的に精製された抗体は、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の分泌配列または細胞外ドメインに特異的に結合する。より好ましい実施形態において、本発明の実質的に精製された抗体は、マーカータンパク質のアミノ酸配列の分泌配列または細胞外ドメインに特異的に結合する。

【０２４４】

本発明のタンパク質に対して指向される抗体は、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的な技術によってタンパク質を単離するために使用できる。さらに、このような抗体は、マーカータンパク質またはそのフラグメントを（例えば、細胞溶解物または細胞上清中で）検出するために使用して、マーカーの発現レベルおよびパターンを評価できる。抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床検査手順の一部として、組織または体液中（例えば、代謝性障害関連の体液中）のタンパク質レベルを監視するために診断的に使用することもできる。検出は、検出可能な物質に結合された本発明の抗体を含む、抗体誘導体の使用によって容易にできる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれ；適切な蛍光物質の例にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが含まれ；発光物質の例にはルミノールが含まれ；生体発光物質の例にはルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、そして適切な放射性物質の例には^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、または^{3}Ｈが含まれる。

【０２４５】

本発明の抗体は、代謝性障害を処置する際の治療剤としてもまた使用されてもよい。好ましい実施形態において、本発明の完全ヒト抗体は、代謝性障害を有するヒト患者、特に、糖尿病または肥満を有する患者の治療的処置のために使用される。別の好ましい実施形態において、マーカータンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体は、治療的処置のために使用される。さらに、このような治療用抗体は、細胞毒素などの治療部分、治療剤、または放射性金属イオンに結合体化された、抗体誘導体またはイムノトキシン含有抗体であってもよい。細胞毒素または細胞毒性剤には、細胞に対して有害な任意の薬剤が含まれる。例には、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、およびこれらのアナログまたはホモログが含まれる。治療剤には、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシル　デカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ　クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（ＡＭＣ））、および抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が含まれるがこれらに限定されない。

【０２４６】

薬物部分が古典的な化学療法剤に限定されるように構築されているわけではないので、本発明の結合体化抗体は、所定の生物学的応答を修飾するために使用できる。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、リボソーム阻害タンパク質（Ｂｅｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第６，１４６，６３１号を参照のこと、この開示は、その全体が本明細書に組み込まれる）、アブリン、リシンＡ、シュードモナスエキソトキシン、またはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、αインターフェロン、βインターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化因子などのタンパク質；または

、例えば、リンホカイン、インターロイキン－１（「ＩＬ－１」）、インターロイキン－２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン－６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」）、または他の成長因子などの生物反応修飾物質を含んでもよい。

【０２４７】

このような治療部分を抗体に結合体化するための技術は周知であり、例えば、Ａｒｎｏｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒｅｉｓｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．（編），ｐｐ．２４３～５６（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）所収；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．，「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第２版），Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（編），ｐｐ．６２３～５３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）所収；Ｔｈｏｒｐｅ，「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｐｉｎｃｈｅｒａ ｅｔ ａｌ．（編），ｐｐ．４７５～５０６（１９８５）所収；「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．（編），ｐｐ．３０３～１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）所収，およびＴｈｏｒｐｅ ｅｔ ａｌ．，「Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，６２：１１９～５８（１９８２）を参照のこと。

【０２４８】

したがって、１つの態様において、本発明は、実質的に精製された抗体、抗体フラグメント、および誘導体を提供し、これらのすべてが、本発明のタンパク質、好ましくは、マーカータンパク質に特異的に結合する。種々の実施形態において、実質的に精製された本発明の抗体、またはそのフラグメント、またはその誘導体は、ヒト抗体、非ヒト抗体、キメラ抗体、および／またはヒト化抗体であり得る。別の態様において、本発明は、非ヒト抗体、抗体フラグメント、および誘導体を提供し、これらのすべてが、本発明のタンパク質、好ましくは、マーカータンパク質に特異的に結合する。このような非ヒト抗体は、ヤギ、マウス、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、ウサギ、またはラットの抗体であり得る。あるいは、本発明の非ヒト抗体は、キメラ抗体および／またはヒト化抗体であり得る。加えて、本発明の非ヒト抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。なおさらなる態様において、本発明は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、および誘導体を提供し、これらのすべてが、本発明のタンパク質、好ましくは、マーカータンパク質に特異的に結合する。このモノクローナル抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および／または非ヒト抗体であり得る。

【０２４９】

本発明は、検出可能な物質に結合体化された本発明の抗体、および使用のための説明書を含むキットもまた提供する。本発明のなお別の態様は、本発明の抗体を含む製薬組成物である。１つの実施形態において、製薬組成物は、本発明の抗体および製薬的に許容され得るキャリアを含む。

【０２５０】

３．予測医学

本発明は、診断アッセイ、予測アッセイ、薬理ゲノミクス、および臨床的な痕跡を監視

することが予後診断（予測）目的のために使用され、それによって個体を予防的に治療する、予測医学の分野に関する。したがって、本発明の１つの態様は、個体が代謝性障害を発症するリスクがあるか否かを決定するために、１種以上のマーカータンパク質または核酸の発現レベルを決定するための診断アッセイに関する。このようなアッセイは、予後診断または予測目的のために使用され、それによって、障害の発症の前に個体を予防的に処置できる。

【０２５１】

本発明のなお別の態様は、臨床試験における本発明のマーカーの発現または活性に対する薬剤（例えば、代謝性障害を阻害するため、または任意の他の障害を処置または予防するためのいずれかのために投与される薬物または他の化合物）の影響を｛すなわち、このような処置が有するかもしれないあらゆる発癌効果を理解するために｝監視することに関する。これらおよび他の薬剤は、以下のセクションにさらに詳細に記載されている。

【０２５２】

Ａ．診断アッセイ

生物試料中のマーカータンパク質または核酸の存在または非存在を検出するための例示的な方法には、試験被験体（例えば、代謝性障害関連体液）から生物試料を入手すること、およびポリペプチドまたは核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、またはｃＤＮＡ）を検出可能な化合物または薬剤と生物試料を接触させることが含まれる。したがって、本発明の検出方法は、例えば、生物試料中で、インビトロならびにインビボで、ｍＲＮＡ、タンパク質、ｃＤＮＡ、またはゲノムＤＮＡを検出するために使用できる。例えば、ｍＲＮＡの検出のためのインビトロ技術には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。マーカータンパク質の検出のためのインビトロ技術には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈殿、および免疫蛍光が含まれる。ゲノムＤＮＡの検出のためのインビトロ技術には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。ｍＲＮＡの検出のためのインビボ技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、ノーザンハイブリダイゼーション、およびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、マーカータンパク質の検出のためのインビボ技術には、タンパク質またはそのフラグメントに対して指向される標識された抗体を被験体に導入することが含まれる。例えば、抗体は放射性マーカーで標識でき、被験体におけるその存在および位置が標準的な画像化技術によって検出できる。

【０２５３】

このような診断および予測アッセイの一般的な原理には、マーカーおよびプローブが相互作用および結合することを許容するために適切な条件下でかつ十分な時間の間、マーカーおよびプローブを含んでもよい試料または反応混合物を調製し、したがって、反応混合物中で除去および／または検出ができる複合体を形成することが含まれる。これらのアッセイは、種々の方法で実施可能である。

【０２５４】

例えば、このようなアッセイを実施するための１つの方法には、基材ともまた呼ばれる固相支持体にマーカーまたはプローブを固着させること、および固相に固着された標的マーカー／プローブ複合体を反応の最後に検出することが含まれる。このような方法の１つの実施形態において、マーカーの存在および／または濃度についてアッセイされる被験体からの試料は、キャリアまたは固相支持体に固着できる。別の実施形態において、逆の状況が可能であり、ここでは、プローブは固相に固着でき、被験体からの試料はアッセイの固着されていない成分として反応させることができる。

【０２５５】

アッセイ成分を固相に固着させるための多くの確立された方法が存在する。これらには、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を通して固定化されているマーカーまたはプローブ分子が含まれるがこれらに限定されない。このようなビオチン化アッセイ成分は、当該分野において公知である技術（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用してビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキ

シースクシンイミド）から調製され、そしてストレプトアビジンコートされた９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）のウェルに固定化できる。特定の実施形態において、固定化アッセイ成分を有する表面は、前もって調製され、保存できる。

【０２５６】

このようなアッセイのための他の適切なキャリアまたは固相支持体には、マーカーまたはプローブが属する分子のクラスに結合可能な任意の物質が含まれる。周知の支持体またはキャリアには、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩、およびマグネタイトが挙げられるがこれらに限定されない。

【０２５７】

上記に言及されたアプローチを用いてアッセイを実施するために、固定化されていない成分は、第２の成分が固着されている固相に加えられる。反応が完了した後で、いかなる形成された複合体も固相上に固定化されているままであるように、複合体形成していない成分は（例えば、洗浄によって）除去されてもよい。固相に固着されたマーカー／プローブ複合体の検出は、本明細書に概説されている多数の方法において達成できる。

【０２５８】

好ましい実施形態において、プローブは、これが固着されていないアッセイ成分であるとき、検出およびアッセイの読みとりの目的のために、直接的または間接的のいずれかで、本明細書において議論されており、かつ当業者に周知である検出可能な標識で標識できる。

【０２５９】

例えば、蛍光エネルギー移動の技術を利用することにより（例えば、Ｌａｋｏｗｉｃｚ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第５，６３１，１６９号；Ｓｔａｖｒｉａｎｏｐｏｕｌｏｓ，ｅｔ　ａｌ．，米国特許第４，８６８，１０３号を参照のこと）、いずれの成分（マーカーまたはプローブ）のさらなる操作または標識もなしで、マーカー／プローブ複合体形成を直接的に検出することもまた可能である。第１の「ドナー」分子上の蛍光団標識は、適切な波長の入射光を用いる励起の際に、その励起された蛍光エネルギーが第２の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、これは、次には吸収されたエネルギーに起因して蛍光を発することが可能であるように選択される。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを単に利用してもよい。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のそれから区別され得るように、異なる波長の光を発光する標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は分子を隔てている距離と関係するので、分子間の空間的な関連性が評価できる。結合が分子間に存在する状況において、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光発光は最大であるべきである。ＦＥＴ結合事象は、当該分野において周知である標準的なフルオロメトリー検出手段を通して（例えば、フルオロメーターを使用して）首尾よく測定できる。

【０２６０】

別の実施形態において、プローブがマーカーを認識する能力の決定は、いずれのアッセイ成分（プローブまたはマーカー）も標識することなく、リアルタイムＢｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ　Ａｎａｌｙｓｉｓ（ＢＩＡ）を使用することによって達成できる（例えば、Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ，Ｓ．ａｎｄ　Ｕｒｂａｎｉｃｚｋｙ，Ｃ．，１９９１，Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８～２３４５およびＳｚａｂｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９－７０５）．本明細書で使用される場合、「ＢＩＡ」または「表面プラズモン共鳴」は、相互作用する因子のいずれも標識することなく、リアルタイムで生物特異的相互作用を研究するための技術である（例えば、ＢＩＡコア）。結合表面における質量の変化（結合事象を示す）は、表面の近くの光の屈折率の変化を生じ（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学的現象）、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用できる検出可能なシグナルを生じる。

【０２６１】

あるいは、別の実施形態において、類似の診断および予後診断アッセイは、液相中の溶質としてマーカーおよびプローブを用いて実施できる。このようなアッセイにおいて、複合体化されたマーカーおよびプローブは、ディファレンシャル遠心分離、クロマトグラフィー、電気泳動、および免疫沈降を含むがこれらに限定されない多数の標準的な技術のいずれかによって、複合体化されていない成分から分離される。ディファレンシャル遠心分離において、マーカー／プローブ複合体は、それらの異なるサイズおよび密度に基づく複合体の異なる沈降平衡に起因して、一連の遠心工程を通して、複合体化されていないアッセイ成分から分離されてもよい（例えば、Ｒｉｖａｓ，Ｇ．，ａｎｄ Ｍｉｎｔｏｎ，Ａ．Ｐ．，１９９３，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ．１８（８）：２８４～７）を参照のこと。標準的なクロマトグラフィー技術もまた、複合体化された分子を複合体化されていない分子から分離するために利用されてもよい。例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーは分子をサイズに基づいて、カラム様式での適切なゲルろ過樹脂の利用を通して分離し、例えば、相対的に大きな複合体は、相対的に小さな複合体化していない成分から分離されてもよい。同様に、複合体化していない成分と比較した場合にマーカー／プローブの相対的に異なる電荷特性は、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂の利用を通して、複合体化していない成分から複合体を区別するように利用されてもよい。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は、当業者に周知である（例えば、Ｈｅｅｇａａｒｄ，Ｎ．Ｈ．，１９９８，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．Ｗｉｎｔｅｒ １１（１～６）：１４１～８；Ｈａｇｅ，Ｄ．Ｓ．，ａｎｄ Ｔｗｅｅｄ，Ｓ．Ａ．Ｊ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ｂ Ｂｉｏｍｅｄ Ｓｃｉ Ａｐｐｌ １９９７ Ｏｃｔ １０；６９９（１～２）：４９９～５２５を参照のこと）。ゲル電気泳動もまた、複合体化されたアッセイ成分を未結合の成分から分離するために利用されてもよい（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．編，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７～１９９９を参照のこと）。この技術において、タンパク質または核酸複合体は、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離される。電気泳動プロセスの間の結合相互作用を維持するために、典型的には、非変性ゲルマトリックス材料および還元剤の非存在下での条件が好ましい。特定のアッセイおよびその成分に対して適切な条件は当業者に周知である。

【０２６２】

特定の実施形態において、マーカーｍＲＮＡのレベルは、当該分野において公知である方法を使用して、生物試料中で、インサイチュ様式とインビトロ様式の両方によって決定できる。「生物試料」という用語は、被験体から単離された組織、細胞、生物学的流体、およびそれらの単離物、ならびに被験体の中に存在する組織、細胞、および流体を含むことが意図される。多くの発現検出方法は単離されたＲＮＡを使用する。インビトロ方法のために、ｍＲＮＡの単離に不利であるとして選択されない任意のＲＮＡ単離技術が、代謝性障害細胞からのＲＮＡの精製のために利用できる（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．編，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １９８７～１９９９を参照のこと）。加えて、多くの組織試料が、例えば、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ（１９８９，米国特許第４，８４３，１５５号）の１段階ＲＮＡ単離プロセスなどの当業者に周知の技術を使用して容易に処理できる。

【０２６３】

単離されたｍＲＮＡは、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、およびプローブアレイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて使用できる。ｍＲＮＡレベルの検出のための１つの好ましい診断方法には、検出される遺伝子によってコードされるｍＲＮＡにハイブリダイズできる核酸分子（プローブ）と、単離されたｍＲＮＡを接触させることを包含する。核酸プローブは、例えば、全長ｃＤＮＡまたはその一部、例えば、少なくとも７、１５、３０、５０、１００、２５０、または５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり得、本発明のマーカーをコードするｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡにストリンジェントな条件下で特異的にハイブリ

ダイズするために十分であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書に記載される。ｍＲＮＡのプローブとのハイブリダイゼーションは、問題のマーカーが発現されていることを示す。

【０２６４】

１つの形式において、例えば、アガロースゲル上で単離されたｍＲＮＡを泳動すること、およびｍＲＮＡをゲルからニトロセルロースなどのメンブレンに転写することによって、ｍＲＮＡは、固体表面に固定化され、プローブと接触される。代替の形式において、プローブは固体表面に固定化され、ｍＲＮＡは、例えば、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ遺伝子チップアレイの中でプローブと接触される。当業者は、本発明のマーカーによってコードされるｍＲＮＡのレベルを検出する際の使用のために公知のｍＲＮＡ検出方法を容易に適合させることができる。

【０２６５】

試料中のｍＲＮＡマーカーのレベルを決定するための代替方法には、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ（Ｍｕｌｌｉｓ，１９８７，米国特許第４，６８３，２０２号に示されている実験の実施形態）、リガーゼ連鎖反応（Ｂａｒａｎｙ，１９９１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：１８９～１９３）、自己持続配列複製（Ｇｕａｔｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：１８７４～１８７８）、転写増幅系（Ｋｗｏｈ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１１７３～１１７７）、Ｑ－Ｂｅｔａ Ｒｅｐｌｉｃａｓｅ（Ｌｉｚａｒｄｉ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：１１９７）、ローリングサークル複製（Ｌｉｚａｒｄｉ ｅｔ ａｌ．米国特許第５，８５４，０３３号）、または任意の他の核酸増幅方法、続いて当業者に公知の技術を使用する、増幅された分子の検出による核酸増幅のプロセスが含まれる。核酸分子が非常に少ない数で存在する場合に、これらの検出スキームは、このような分子の検出のために特に有用である。本明細書で使用される場合、増幅プライマーは、１つの遺伝子（それぞれプラス鎖およびマイナス鎖または逆もまた同様）の５’または３’領域にアニールすることができる１対の核酸分子であると定義され、その間に短い領域を含む。一般的に、増幅プライマーは、約１０～３０ヌクレオチド長であり、約５０～２００ヌクレオチド長の領域に隣接する。適切な条件下でかつ適切な試薬を用いて、このようなプライマーは、プライマーによって隣接されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

【０２６６】

インサイチュ方法のために、ｍＲＮＡは、検出の前に細胞から単離される必要はない。このような方法において、細胞または組織試料は、公知の組織学的方法を使用して調製／処理される。次いで、試料は、支持体、典型的には、ガラススライド上に固定化され、次いで、マーカーをコードするｍＲＮＡにハイブリダイズできるプローブと接触される。

【０２６７】

マーカーの絶対的な発現レベルに基づいて決定を行うための代替として、決定は、標準化されたマーカーの発現レベルに基づいてもよい。発現レベルは、マーカーではない遺伝子、例えば、構成的に発現されるハウスキーピング遺伝子の発現に対してマーカーの発現を比較することによって、マーカーの絶対的な発現レベルを補正することによって標準化される。標準化のための適切な遺伝子には、アクチン遺伝子または上皮細胞特異的遺伝子などのハウスキーピング遺伝子が挙げられる。この標準化は、１つの試料、例えば、患者試料中の発現レベルの、別の試料、例えば、非代謝性障害試料に対する比較、または異なる供給源からの試料間の比較を可能にする。

【０２６８】

あるいは、発現レベルは、相対的な発現レベルとして提供できる。マーカーの相対的な発現レベルを決定するために、マーカーの発現レベルは、問題の試料についての発現レベルの決定の前に、代謝性障害単離物、好ましくは、５０以上の試料に対して、１０以上の正常単離物の試料について決定される。大きな数の試料でアッセイされた遺伝子の各々の平均発現レベルが決定され、これは、マーカーについてのベースライン発現レベルとして

使用される。次いで、試験試料について決定されたマーカーの発現レベル（発現の絶対レベル）は、そのマーカーについて得られた平均発現値によって除算される。これは相対発現レベルを示す。

【０２６９】

好ましくは、ベースライン決定において使用される試料は、代謝性障害と関連する組織からである。細胞供給源の選択は、相対発現レベルの使用に依存する。平均発現スコアとして正常組織中で見い出された発現を使用することは、アッセイされたマーカーが（正常細胞に対して）代謝性障害特異的であるか否かを認証する際に補助となる。加えて、より多くのデータが蓄積するにつれて、平均発現値が修正でき、蓄積データに基づく改善された相対発現値を提供する。

【０２７０】

本発明の別の実施形態において、マーカータンパク質が検出される。本発明のマーカータンパク質を検出するための好ましい因子は、このようなタンパク質またはそのフラグメントに結合可能な抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメントまたは誘導体（例えば、ＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$）が使用できる。「標識された」という用語は、プローブまたは抗体に関して、プローブまたは抗体に検出可能な物質をカップリングすること（すなわち、物理的に連結すること）によるプローブまたは抗体の直接的標識、ならびに直接的に標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含することが意図される。間接的標識の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、およびビオチンが蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出できるようなビオチンを用いるＤＮＡプローブの末端標識が含まれる。

【０２７１】

細胞からのタンパク質は、当業者に周知である技術を使用して単離できる。利用されるタンパク質単離方法は、例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，１９８８，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）に記載されているようなものであり得る。

【０２７２】

試料が所定の抗体に結合するタンパク質を含むか否かを決定するために種々の形式が利用できる。このような形式の例には、エンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ウェスタンブロット分析、および酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）が含まれるがこれらに限定されない。当業者は、細胞が本発明のマーカーを発現するか否かを決定する際の使用のために、公知のタンパク質／抗体検出方法を容易に適合できる。

【０２７３】

１つの形式において、抗体または抗体フラグメントまたは誘導体は、発現されたタンパク質を検出するために、ウェスタンブロットまたは免疫蛍光技術などの方法において使用できる。このような用途において、抗体またはタンパク質のいずれかを固体支持体上に固定化することが一般的に好ましい。適切な固相支持体またはキャリアには、抗原または抗体を結合可能である任意の支持体が含まれる。周知の支持体またはキャリアには、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩、およびマグネタイトが挙げられる。

【０２７４】

当業者は、抗体または抗原を結合するための多くの他の適切なキャリアを知っており、本発明に伴う使用のためにこのような支持体を適合できる。例えば、代謝性障害細胞から単離されたタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で泳動でき、ニトロセルロ

ースなどの固相支持体上に固定化できる。次いで、支持体は適切な緩衝液で洗浄され、検出可能に標識された抗体を用いる処理を行うことができる。次いで、固相支持体は、緩衝液を用いる２度目の洗浄をされ、未結合の抗体を除去できる。次いで、固体支持体上の結合した標識の量が従来的な手段によって検出できる。

【０２７５】

本発明は、生物試料中のマーカータンパク質または核酸の存在を検出するためのキットもまた包含する。このようなキットは、被験体が糖尿病または肥満などの代謝性障害に罹患しているか、またはそれを発症するリスクがあるかを決定するために使用できる。例えば、このキットは、生物試料中のマーカータンパク質または核酸を検出可能な標識化合物または薬剤、および試料中のタンパク質またはｍＲＮＡの量を決定するための手段を含むことができる（例えば、タンパク質もしくはそのフラグメントを結合する抗体、またはタンパク質をコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）。キットは、そのキットを使用して得られる結果を解釈するための説明書もまた含むことができる。

【０２７６】

抗体ベースのキットについては、そのキットは例えば、以下を含んでもよい：（１）マーカータンパク質に結合している第１の抗体（例えば、固体支持体に結合されている）；および、任意に、（２）タンパク質または第１の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識に結合体化されている第２の異なる抗体。

【０２７７】

オリゴヌクレオチドベースのキットについては、このキットは、例えば、以下を含んでもよい：（１）マーカータンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または（２）マーカー核酸分子を増幅するために有用な１対のプライマー。このキットは、例えば、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定剤もまた含むことができる。このキットは、検出可能な標識を検出するために必要な成分（例えば、酵素または基質）をさらに含むことができる。このキットは、アッセイでき、試験試料と比較できる対照試料または一連の対照試料もまた含むことができる。キットの各成分は個々の容器の中に入れることができ、キットを使用して実施されたアッセイの結果を解釈するための説明書とともにすべての様々な容器が単一のパッケージの中にあることができる。

【０２７８】

Ｂ．薬理ゲノミクス

本発明のマーカーは、薬理ゲノミクスマーカーとしてもまた有用である。本明細書で使用される場合、「薬理ゲノミクスマーカー」とは、目的の生化学的マーカーであり、その発現レベルは患者の特定の臨床薬物応答または感受性と相関する（例えば、ＭｃＬｅｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　３５（１２）：１６５０－１６５２に概説されている）。薬理ゲノミクスマーカー発現の存在または量は、患者の予測される応答に関連し、より特定には、特定の薬物または薬物のクラスを用いる治療に対する患者の代謝性障害に関連する。患者における１つ以上の薬理ゲノミクスマーカーの発現の存在または量を評価することによって、患者にとって最も適切であり、より大きな程度の成功を有すると予測される薬物治療が選択され得る。例えば、患者における特定のマーカーによってコードされるＲＮＡまたはタンパク質の存在または量に基づいて、患者において存在する可能性がある特定の代謝性障害の処置のために最適化される薬物または処置の経路が選択されてもよい。それゆえに、薬理ゲノミクスマーカーの使用は、異なる薬物またはレジメンを試すことなく、各々の代謝性障害のために最も適切な処置を選択または設計することを可能にする。

【０２７９】

薬理ゲノミクスの別の態様は、身体が薬物に対して作用する方法を変更する遺伝的条件を扱う。これらの薬理ゲノミクス条件は、まれな欠損または多型のいずれかとして起こる可能性がある。例えば、グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤ）欠

損は一般的な遺伝性酵素病であり、ここでは、主要な臨床的合併症は、酸化性薬物（抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛剤、ニトロフラン）の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【０２８０】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度と期間の両方の主要な決定要因である。薬物代謝酵素（例えば、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２（ＮＡＴ２）およびシトクロムＰ４５０酵素ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９）の遺伝子多型の発見は、ある患者がなぜ予測された薬物効果を示さないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取後に誇張された薬物応答および深刻な毒性を示すことについての説明を提供する。これらの多型は、集団中で２つの表現型、広範な代謝者（ｅｘｔｅｎｓｉｖｅ ｍｅｔａｂｏｌｉｚｅｒ（ＥＭ））および乏しい代謝者（ｐｏｏｒ ｍｅｔａｂｏｌｉｚｅｒ（ＰＭ））として表現される。ＰＭの有病率は異なる集団の間で異なる。例えば、ＣＹＰ２Ｄ６をコードする遺伝子は高度に多型性であり、いくつかの変異がＰＭ中で同定されており、これらはすべて、機能的ＣＹＰ２Ｄ６の非存在に導く。ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の乏しい代謝者は、彼らが標準用量を受容するときに、誇張された薬物応答および副作用を極めて頻繁に経験している。代謝物が活性治療部分である場合、そのＣＹＰ２Ｄ６によって形成される代謝物モルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、ＰＭは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準用量に応答しないいわゆる超迅速代謝者である。最近、超迅速代謝の分子的基礎がＣＹＰ２Ｄ６遺伝子増幅に起因して同定された。

【０２８１】

したがって、個体における本発明のマーカーの発現レベルが決定でき、それによって、個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択する。加えて、薬理ゲノミクス研究は、個体の薬物応答性表現型の同定に対して、薬物代謝酵素をコードする多型性対立遺伝子の遺伝子型決定を適用するために使用できる。この知見は、投薬または薬物選択に適用されるとき、有害な反応または治療の失敗を回避でき、したがって、本発明のマーカーの発現の調節因子を用いて被験体を治療するときに、治療的または予防的な有効性を増強する。

【０２８２】

Ｃ．臨床試験の監視

本発明のマーカーの発現レベルに対する薬物の影響を監視することは、基礎的な薬物スクリーニングにおいてのみならず、臨床試験においてもまた適用できる。例えば、薬剤がマーカー発現に影響を与えるための有効性は、代謝性障害についての処置を受ける被験体の臨床試験において監視される。好ましい実施形態において、本発明は、（ｉ）薬剤の投与の前に被験体から投与前試料を得る工程；（ｉｉ）投与前試料における１種以上の選択された本発明のマーカーの発現レベルを検出する工程；（ｉｉｉ）被験体からの１種以上の投与後試料を得る工程；（ｉｖ）投与後試料中のマーカーの発現レベルを検出する工程；（ｖ）投与前試料のマーカーの発現レベルを、投与後試料中のマーカーの発現レベルと比較する工程；および（ｖｉ）それに応じて、被験体への薬剤の投与を変更する工程を包含する、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補）を用いる被験体の治療の有効性を監視するための方法を提供する。例えば、処置の過程の間のマーカー遺伝子の発現の増加は、非効果的な投薬量および投薬量の増加が望ましいことを示し得る。逆に、マーカー遺伝子の発現の減少は、有効な処置および投薬量を変更する必要がないことを示し得る。

【０２８３】

Ｄ．アレイ

本発明は、本発明のマーカーを含有するアレイもまた含む。アレイは、アレイ中の１種以上の遺伝子の発現をアッセイするために使用できる。１つの実施形態において、アレイは、アレイ中の遺伝子の組織特異性を確実にするために組織中の遺伝子発現をアッセイするために使用できる。この様式において、約７６００個までの遺伝子が発現について同時

にアッセイできる。このことは、１つ以上の組織において特異的に発現される一連の遺伝子を示すプロフィールが開発されることを可能にする。

【０２８４】

このような定性的な決定に加えて、本発明は、遺伝子発現の定量を可能にする。したがって、組織特異性のみならず、組織における一連の遺伝子の発現レベルもまた確認可能である。したがって、遺伝子は、それらの組織発現それ自体およびその組織中での発現レベルに基づいてグループ分けできる。これは、例えば、組織の間または組織の中で遺伝子発現の関連性を確認する際に有用である。したがって、１つの組織は摂動する可能性があり、第２の組織中での遺伝子発現に対する効果が決定できる。この状況において、生物学的刺激に応答した、１つの細胞型の別の細胞型に対する効果が決定できる。このような決定は、例えば、遺伝子発現レベルにおける細胞－細胞相互作用の効果を知るために有用である。薬剤が１つの細胞型を処置するために治療的に投与されるが、別の細胞型に望ましくない効果を有する場合、本発明は、望ましくない効果の分子的基礎を決定するためのアッセイを提供し、したがって、反対に作用する薬剤を同時投与し、またはさもなくば望ましくない効果を処置するための機会を提供する。同様に、単一の細胞型の中でさえ、望ましくない生物学的効果は分子レベルにおいて決定できる。したがって、標的遺伝子以外の発現に対する薬剤の効果は、確認され、打ち消されることができる。

【０２８５】

別の実施形態において、アレイは、アレイ中の１種以上の遺伝子の発現の時間経過を監視するために使用できる。このことは、本明細書に開示されるような種々の生物学的状況において、例えば、代謝性障害の発症、代謝性障害の進行、および代謝性障害と関連する細胞形質転換のようなプロセスにおいて行われる。

【０２８６】

アレイは、同じ細胞または異なる細胞における、１つの遺伝子の発現の他の遺伝子の発現に対する有効性を確認するためにもまた有用である。これは、例えば、最終的なまたは下流の標的が調節できない場合に、治療的介入のために代わりの分子標的の選択を提供する。

【０２８７】

アレイは、正常細胞および異常細胞における１つ以上の遺伝子の示差的な発現パターンを確認するためにもまた有用である。これは、診断または治療的介入のための分子標的として働くことができる一連の遺伝子を提供する。

【０２８８】

ＶＩ．試料を得るための方法

本発明の方法において有用な試料には、本発明のマーカーを発現する任意の組織、細胞、生検、または体液試料が挙げられる。１つの実施形態において、試料は、組織、細胞、全血、血清、血漿、口腔掻爬物（ｂｕｃｃａｌ　ｓｃｒａｐｅ）、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、または気管支肺胞洗浄液であり得る。好ましい実施形態において、組織試料は、血液または尿試料を含む代謝性障害試料である。

【０２８９】

身体試料は、例えば、生検の使用、または一定の領域を掻爬もしくはスワブすること、または体液を吸引するために針を使用することを含む、当該分野において公知である種々の技術によって被験体から得られることができる。種々の体液試料を収集するための方法は当該分野において周知である。

【０２９０】

本発明のマーカーを検出および定量するために適切な組織試料は、当業者に公知である方法にしたがって、更新され、凍結され、または固定されてもよい。適切な組織試料は、好ましくは、さらなる分析のために、切片化され、顕微鏡スライド上に配置される。あるいは、固形物試料、すなわち、組織試料は、可溶化および／またはホモジナイズされ、続いて、可溶性抽出物と同様に分析されてもよい。

【０２９１】

１つの実施形態において、新鮮に得られた組織試料は、例えば、液体窒素またはジフルオロジクロロメタンを使用して凍結される。凍結試料は、例えば、ＯＣＴを使用する切片化のためにマウントされ、クリオスタット中で連続的に切片化される。連続切片は、ガラス顕微鏡スライド上で収集される。免疫組織化学染色のために、切片がスライドに貼り付くことを確実にするために、スライドは、例えば、クロム－ミョウバン、ゼラチン、またはポリ－Ｌ－リジンでコートされてもよい。別の実施形態において、試料は、切片化の前に固定および包埋される。例えば、組織試料は、例えば、ホルマリン中に固定化されてもよく、連続的に脱水され、例えば、パラフィン中に包埋されてもよい。

【０２９２】

一旦試料が得られると、本発明のマーカーを検出および定量するために適切であることが当該分野において知られている任意の方法が（核酸レベルまたはタンパク質のいずれかで）使用されてもよい。このような方法は当該分野において周知であり、これらには、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、サザンブロット、免疫組織化学、ＥＬＩＳＡ、例えば、増幅ＥＬＩＳＡ、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、質量分析、例えば、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦおよびＳＥＬＤＩ－ＴＯＦ、核酸ハイブリダイゼーション技術、核酸逆転写法、および核酸増幅法が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のマーカーの発現は、例えば、これらのタンパク質を特異的に結合する抗体を使用して、タンパク質レベルで検出される。

【０２９３】

本発明のマーカーを抗体結合に利用可能にするために、試料は修飾される必要がある可能性がある。免疫細胞化学または免疫組織化学の特定の態様において、スライドは、前処理された緩衝液に移され、任意に、抗原利用性を増加するために加熱されてもよい。前処理緩衝液中での試料の加熱は、細胞の脂質二重層を急速に破壊し、抗原（新鮮な試料における場合である可能性はあるが、典型的には、固定された試料で起こることではない）を抗体結合に対してより利用可能にする。「前処理緩衝液」および「調製緩衝液」という用語は、特に、抗体結合のために本発明のマーカーの利用可能性を増加することによって免疫染色のための細胞学的または組織学的試料を調製するために使用される緩衝液をいうために、本明細書では交換可能に使用される。前処理緩衝液は、ｐＨ特異的塩溶液、ポリマー、洗剤、または、例えば、エチルオキシレートアニオン性または非イオン性界面活性剤、アルカノエートまたはアルコキシレートもしくはこれらの界面活性剤のブレンドさえ、もしくは胆汁塩の使用さえなどの非イオン性もしくはアニオン性界面活性剤を含んでもよい。前処理緩衝液は、例えば、０．１％～１％のデオキシコール酸、ナトリウム塩の溶液、またはラウレス－１３－カルボン酸ナトリウム（例えば、Ｓａｎｄｏｐａｎ　ＬＳ）の溶液およびエトキシレートアニオン性錯体であってもよい。ある実施形態において、前処理緩衝液は、スライド保存緩衝液としてもまた使用されてもよい。

【０２９４】

抗体結合のためにより利用可能である本発明のマーカータンパク質を作製するための任意の方法が本発明の実施において使用されてもよく、これには、当該分野において公知である抗原回復方法が含まれる。例えば、Ｂｉｂｂｏ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ａｃｔａ．Ｃｙｔｏｌ．４６：２５～２９；Ｓａｑｉ，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｄｉａｇｎ．Ｃｙｔｏｐａｔｈｏｌ．２７：３６５～３７０；Ｂｉｂｂｏ，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ａｎａｌ．Ｑｕａｎｔ．Ｃｙｔｏｌ．Ｈｉｓｔｏｌ．２５：８～１１を参照のこと、これらの各々の全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９５】

マーカータンパク質の利用可能性を増加するための前処理後、試料は、適切なブロッキング剤、例えば、過酸化水素などのペルオキシダーゼブロッキング試薬を使用してブロックされてもよい。ある実施形態において、試料は、抗体の非特異的結合を妨害するために、タンパク質ブロッキング試薬を使用してブロックされてもよい。タンパク質ブロッキング試薬には、タンパク質、精製カゼインが含まれてもよい。次いで、抗体、特に、本発明のマーカーに特異的に結合するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、試料と

ともにインキュベートされる。当業者は、ある場合においては、患者試料中のマーカータンパク質上の複数のエピトープを検出することによって、より多くの正確な予後診断または診断が得られるかもしれないことを認識している。それゆえに、特定の実施形態において、本発明のマーカーの異なるエピトープに指向される少なくとも２つの抗体が使用される。１つよりも多くの抗体が使用される場合、これらの抗体は、個々の抗体試薬として連続的に、または抗体カクテルとして同時に加えられてもよい。あるいは、各々個々の抗体が、同じ患者からの別個の試料に加えられ、得られたデータがプールされてもよい。

【０２９６】

抗体結合を検出するための技術は当該分野において周知である。本発明のマーカーへの抗体結合は、抗体結合のレベルに対応し、したがって、マーカータンパク質発現レベルに対応する検出可能なシグナルを生成する化学試薬の使用を通して検出されてもよい。本発明の免疫組織化学または免疫細胞化学の方法の１つにおいて、抗体結合は、標識されたポリマーに結合体化されている二次抗体の使用を通して検出される。標識されたポリマーの例には、ポリマー－酵素結合体が含まれるがこれらに限定されない。これらの複合体における酵素は、典型的には、抗原－抗体結合部位における色素原の沈着を触媒するために使用され、それによって、目的のバイオマーカーの発現レベルに対応する細胞染色を生じる。特に関心が持たれる酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）およびアルカリホスファターゼ（ＡＰ）が含まれるがこれらに限定されない。

【０２９７】

本発明の１つの特定の免疫組織化学または免疫細胞化学方法において、本発明のマーカーへの抗体結合は、二次抗体に結合体化されているＨＲＰ標識ポリマーの使用を通して検出される。抗体結合はまた、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に結合する種特異的プローブ試薬、および種特異的プローブ試薬に結合する、ＨＲＰに結合体化されたポリマーの使用を通して検出できる。スライドは、任意の色素原、例えば、色素原３，３－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）を使用する抗体結合について染色され、次いで、ヘマトキシリンで、および任意に、水酸化アンモニウムまたはＴＢＳ／Ｔｗｅｅｎ－２０などの青色化剤で対比染色される。他の適切な色素原には、例えば、３－アミノ－９－エチルカルバゾール（ＡＥＣ）が挙げられる。本発明のある態様において、スライドは、細胞染色、例えば、蛍光染色（すなわち、マーカー発現）を評価するために、細胞技術者および／または病理学者によって顕微鏡的に詳細に観察される。あるいは、試料は、自動化顕微鏡を経由して、またはポジティブ染色細胞の同定を容易にするコンピュータソフトウェアの補助を伴って人によって、詳細に観察されてもよい。

【０２９８】

抗体結合の検出は、抗マーカー抗体を検出可能な物質に結合させることによって容易にできる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、βガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれ；適切な蛍光物質の例にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが含まれ；発光物質の例にはルミノールが含まれ；生体発光物質の例にはルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、そして適切な放射性物質の例には^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、または^{3}Ｈが含まれる。

【０２９９】

本発明の１つの実施形態において、凍結試料は上記のように調製され、引き続いて、例えば、Ｔｒｉｓ緩衝化生理食塩水（ＴＢＳ）を使用して適切な濃度まで希釈された本発明のマーカーに対する抗体で染色される。一次抗体は、ビオチン化抗免疫グロブリン中でスライドをインキュベートすることによって検出できる。このシグナルは、任意に、抗原のジアミノベンジジン沈殿を使用して、増幅および可視化できる。さらに、スライドは、任

意に、細胞を可視化するために、例えば、ヘマトキシリンで対比染色できる。

【０３００】

別の実施形態において、固定および包埋された試料は、本発明のマーカーに対する抗体で染色され、凍結切片について上記に記載されたように対比染色される。加えて、試料は、抗体染色を可視化するために、シグナルを増幅するための試薬で任意に処理されてもよい。例えば、ビオチニル－チラミドのペルオキシダーゼ触媒性沈着物が使用されてもよく、これは、次には、ペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン（Ｃａｔａｌｙｚｅｄ　Ｓｉｇｎａｌ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ（ＣＳＡ）Ｓｙｓｔｅｍ，ＤＡＫＯ，Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ，ＣＡ）と反応される。

【０３０１】

組織ベースのアッセイ（すなわち、免疫組織化学）は、本発明のマーカーを検出および定量する好ましい方法である。１つの実施形態において、本発明のマーカーの存在または非存在は、免疫組織化学によって決定されてもよい。１つの実施形態において、免疫組織化学分析は、マーカーを欠く細胞が染色しないように、低濃度の抗マーカー抗体を使用する。別の実施形態において、本発明のマーカーの存在または非存在は、マーカータンパク質を欠く細胞が過度に染色しないように、高濃度の抗マーカー抗体を使用する免疫組織化学法を使用して決定される。染色しない細胞は、変異したマーカーを含み、抗原的に認識可能なマーカータンパク質を産生することに失敗しているか、またはマーカーレベルを調節する経路が調節不全であり、定常状態での無視できるほどのマーカータンパク質の発現を生じる細胞であるかのいずれかである。

【０３０２】

当業者は、本発明の方法を実施するために使用される特定の抗体の濃度が、本発明のマーカーについての抗体の特異性の結合レベルのための時間、および試料調製の方法などの要因に依存して変化することを認識している。さらに、複数の抗体が使用されるとき、必要とされる濃度は、抗体が試料に適用される順番によって、例えば、カクテルとして同時に、または個々の抗体試薬として連続的にかによって影響を受けるかもしれない。さらに、本発明のマーカーへの抗体結合を可視化するために使用される検出化学はまた、所望のシグナル対ノイズ比を生じるために最適化されなければならない。

【０３０３】

本発明の１つの実施形態において、プロテオミック方法、例えば、質量分析が、本発明のマーカータンパク質を検出および定量するために使用される。例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析（ＳＥＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）、これは、血清などの生物試料のタンパク質結合チップへの適用を含み（Ｗｒｉｇｈｔ，Ｇ．Ｌ．，Ｊｒ．，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｅｘｐｅｒｔ　Ｒｅｖ　Ｍｏｌ　Ｄｉａｇｎ　２：５４９；Ｌｉ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｃｌｉｎ　Ｃｈｅｍ　４８：１２９６；Ｌａｒｏｎｇａ，Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｄｉｓ　Ｍａｒｋｅｒｓ　１９：２２９；Ｐｅｔｒｉｃｏｉｎ，Ｅ．Ｆ．，ｅｔ　ａｌ．（２００２）３５９：５７２；Ａｄａｍ，Ｂ．Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６２：３６０９；Ｔｏｌｓｏｎ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｌａｂ　Ｉｎｖｅｓｔ　８４：８４５；Ｘｉａｏ，Ｚ．，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６１：６０２９）、ＰＹ－Ｓｈｃおよび／またはｐ６６－Ｓｈｃタンパク質を検出および定量するために使用できる。質量分析法は、例えば、米国特許第５，６２２，８２４号、同第５，６０５，７９８号、および同第５，５４７，８３５号に記載されており、これらの各々の全体の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【０３０４】

他の実施形態において、本発明のマーカーの発現は核酸レベルで検出される。発現を評価するための核酸ベースの技術は当該分野において周知であり、これには、例えば、被験体からの試料中のマーカーｍＲＮＡのレベルを決定することが含まれる。多くの発現検出方法は単離されたＲＮＡを使用する。ｍＲＮＡの単離に対して選択されない任意のＲＮＡ

単離技術が、本発明のマーカーを発現する細胞からのＲＮＡの精製のために利用できる（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，編，（１９８７～１９９９）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋを参照のこと）。加えて、多数の組織試料が、当業者に周知である技術、例えば、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉの１段階ＲＮＡ単離プロセス（１９８９，米国特許第４，８４３，１５５号）などを使用して容易に処理できる。

【０３０５】

「プローブ」という用語は、本発明のマーカー、例えば、ヌクレオチド転写物および／またはタンパク質に選択的に結合することが可能である任意の分子をいう。プローブは、当業者によって合成でき、または適切な生物学的調製物から誘導できる。プローブは、標識されるように特に設計されてもよい。プローブとして利用できる分子の例には、ＲＮＡ、ＤＮＡ、タンパク質、抗体、および有機分子が含まれるがこれらに限定されない。

【０３０６】

単離されたｍＲＮＡは、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、およびプローブアレイを含むがこれらに限定されないハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて使用できる。ｍＲＮＡレベルの検出のための１つの方法は、マーカーｍＲＮＡにハイブリダイズできる核酸分子（プローブ）と単離されたｍＲＮＡを接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、全長ｃＤＮＡ、またはその一部であり得、例えば、少なくとも７、１５、３０、５０、１００、２５０、または５００ヌクレオチド長であり、ストリンジェントな条件下でマーカーゲノムＤＮＡに特異的にハイブリダイズするのに十分である。

【０３０７】

１つの実施形態において、ｍＲＮＡは固体表面に固定化され、アガロースゲル上で単離されたｍＲＮＡを泳動すること、およびゲルからニトロセルロースなどのメンブレンにｍＲＮＡを転写することによってプローブと接触される。代替の実施形態において、プローブは固体表面に固定化され、ｍＲＮＡは、例えば、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ遺伝子チップアレイの中でプローブと接触される。当業者は、マーカーｍＲＮＡのレベルを検出する際の使用のために公知のｍＲＮＡ検出方法を容易に適合させることができる。

【０３０８】

試料中のマーカーｍＲＮＡのレベルを決定するための代替方法には、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ（Ｍｕｌｌｉｓ，１９８７，米国特許第４，６８３，２０２号に示されている実験の実施形態）、リガーゼ連鎖反応（Ｂａｒａｎｙ，１９９１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：１８９～１９３）、自己持続配列複製（Ｇｕａｔｅｌｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：１８７４～１８７８）、転写増幅系（Ｋｗｏｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１１７３～１１７７）、Ｑ－Ｂｅｔａ　Ｒｅｐｌｉｃａｓｅ（Ｌｉｚａｒｄｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：１１９７）、ローリングサークル複製（Ｌｉｚａｒｄｉ　ｅｔ　ａｌ．米国特許第５，８５４，０３３号）、または任意の他の核酸増幅方法、続いて当業者に公知の技術を使用する、増幅された分子の検出による核酸増幅のプロセスが含まれる。核酸分子が非常に少ない数で存在する場合に、これらの検出スキームは、このような分子の検出のために特に有用である。本発明の特定の態様において、マーカー発現は、定量的蛍光性ＲＴ－ＰＣＲ（すなわち、ＴａｑＭａｎ（商標）システム）によって評価される。このような方法は、典型的には、本発明のマーカーに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対を利用する。公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを設計するための方法は当該分野において周知である。

【０３０９】

本発明のマーカーの発現レベルは、メンブレンブロット（ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析において使用されるものなど）。またはマイクロウェル、サンプルチューブ、ゲル、ビーズ、またはファイバー（または結合した核酸を含む任意

の固体支持体）を使用して監視されてもよい。米国特許第５，７７０，７２２号、同第５，８７４，２１９号、同第５，７４４，３０５号、同第５，６７７，１９５号、および同第５，４４５，９３４号を参照のこと、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。マーカー発現の検出は、溶液中の核酸プローブを使用することもまた含んでもよい。

【０３１０】

本発明の１つの実施形態において、マイクロアレイは、本発明のマーカーの発現を検出するために使用される。マイクロアレイは、異なる実験間の再現性により、この目的のために特に良好に適している。ＤＮＡマイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルの同時測定のための１つの方法を提供する。各アレイは、固体支持体に結合された捕捉プローブの再現可能なパターンからなる。標識されたＲＮＡまたはＤＮＡは、アレイ上の相補性プローブにハイブリダイズされ、次いで、レーザースキャニングによって検出される。アレイ上の各プローブについてのハイブリダイゼーション強度は、測定され、相対的な遺伝子発現レベルを表す定量値に変換される。米国特許第６，０４０，１３８号、同第５，８００，９９２号および同第６，０２０，１３５号、同第６，０３３，８６０号および同第６，３４４，３１６号を参照のこと、これらは参照により本明細書に組み込まれる。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、試料中の多数のＲＮＡのための遺伝子発現プロフィールを決定するために特に有用である。

【０３１１】

リン酸化マーカーの量、および／または本発明のマーカーの量の数学的な関連性は、当業者に公知である回帰分析を含んでもよい、本発明の方法を使用して、代謝性障害について治療される被験体の生存、代謝性障害を処置するための処置レジメンの有効性などを計算するために使用されてもよい。例えば、適切な回帰モデルとしては、ＣＡＲＴ（例えば、Ｈｉｌｌ，Ｔ，ａｎｄ　Ｌｅｗｉｃｋｉ，Ｐ．（２００６）「ＳＴＡＴＩＳＴＩＣＳ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」ＳｔａｔＳｏｆｔ，Ｔｕｌｓａ，ＯＫ），Ｃｏｘ（例えば、ｗｗｗ．ｅｖｉｄｅｎｃｅ－ｂａｓｅｄ－ｍｅｄｉｃｉｎｅ．ｃｏ．ｕｋ）、指数関数、正規、および対数正規（例えば、ｗｗｗ．ｏｂｇｙｎ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｍｒｇ／ｓｔａｔｓｂｏｏｋ／ｓｔｓｕｒｖａｎ．ｈｔｍｌ）、ロジスティック（例えば、ｗｗｗ．ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｌｏｇｉｓｔｉｃ＿ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎまたはｈｔｔｐ：／／ｆａｃｕｌｔｙ．ｃｈａｓｓ．ｎｃｓｕ．ｅｄｕ／ｇａｒｓｏｎ／ＰＡ７６５／ｌｏｇｉｓｔｉｃ．ｈｔｍ）、パラメトリック、ノンパラメトリック、セミパラメトリック（例えば、ｗｗｗ．ｓｏｃｓｅｒｖ．ｍｃｍａｓｔｅｒ．ｃａ／ｊｆｏｘ／Ｂｏｏｋｓ／Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ）、線形（例えば、ｗｗｗ．ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｌｉｎｅａｒ＿ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎまたはｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｕｒｖｅｆｉｔ．ｃｏｍ／ｌｉｎｅａｒ＿ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ．ｈｔｍ）、または加法（例えば、ｗｗｗ．ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｇｅｎｅｒａｌｉｚｅｄ＿ａｄｄｉｔｉｖｅ＿ｍｏｄｅｌまたはｈｔｔｐ：／／ｓｕｐｐｏｒｔ．ｓａｓ．ｃｏｍ／ｒｎｄ／ａｐｐ／ｄａ／ｎｅｗ／ｄａｇａｍ．ｈｔｍｌ）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０３１２】

１つの実施形態において、回帰分析にはリン酸化マーカーの量が含まれる。別の実施形態において、回帰分析にはマーカーの数学的関連性が含まれる。なお別の実施形態において、リン酸化マーカーの量および／またはマーカーの数学的関連性の回帰分析には、さらなる臨床的および／または分子の共変量が含まれる。このような臨床的共変量には、処置レジメン、臨床的結果（例えば、疾患特異的な生存、治療の失敗）、および／または診断後の時間の関数としての臨床的結果、治療の開始後の時間、および／または処置の完了後の時間が含まれるがこれらに限定されない。

【０３１３】

別の実施形態において、リン酸化マーカーの量および／またはマーカーの数学的関連性の回帰分析は、当業者に公知である回帰分析の方法を含んでもよい、本発明の方法を使用して、代謝性障害について処置された被験体の生存、代謝性障害を処置するための処置レ

ジメンの有効性などを計算するために使用されてもよい。例えば、適切な回帰モデルとしては、ＣＡＲＴ（例えば、Ｈｉｌｌ，Ｔ，ａｎｄ　Ｌｅｗｉｃｋｉ，Ｐ．（２００６）「ＳＴＡＴＩＳＴＩＣＳ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」ＳｔａｔＳｏｆｔ，Ｔｕｌｓａ，ＯＫ），Ｃｏｘ（例えば、ｗｗｗ．ｅｖｉｄｅｎｃｅ－ｂａｓｅｄ－ｍｅｄｉｃｉｎｅ．ｃｏ．ｕｋ）、指数関数、正規、および対数正規（例えば、ｗｗｗ．ｏｂｇｙｎ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｍｒｇ／ｓｔａｔｓｂｏｏｋ／ｓｔｓｕｒｖａｎ．ｈｔｍｌ）、ロジスティック（例えば、ｗｗｗ．ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｌｏｇｉｓｔｉｃ＿ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎまたはｈｔｔｐ：／／ｆａｃｕｌｔｙ．ｃｈａｓｓ．ｎｃｓｕ．ｅｄｕ／ｇａｒｓｏｎ／ＰＡ７６５／ｌｏｇｉｓｔｉｃ．ｈｔｍ）、パラメトリック、ノンパラメトリック、セミパラメトリック（例えば、ｗｗｗ．ｓｏｃｓｅｒｖ．ｍｃｍａｓｔｅｒ．ｃａ／ｊｆｏｘ／Ｂｏｏｋｓ／Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ）、線形（例えば、ｗｗｗ．ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｌｉｎｅａｒ＿ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎまたはｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｕｒｖｅｆｉｔ．ｃｏｍ／ｌｉｎｅａｒ＿ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ．ｈｔｍ）、または加法（例えば、ｗｗｗ．ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｇｅｎｅｒａｌｉｚｅｄ＿ａｄｄｉｔｉｖｅ＿ｍｏｄｅｌまたはｈｔｔｐ：／／ｓｕｐｐｏｒｔ．ｓａｓ．ｃｏｍ／ｒｎｄ／ａｐｐ／ｄａ／ｎｅｗ／ｄａｇａｍ．ｈｔｍｌ）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０３１４】

１つの実施形態において、回帰分析にはリン酸化マーカーの量が含まれる。別の実施形態において、回帰分析にはマーカーの数学的関連性が含まれる。なお別の実施形態において、リン酸化マーカーの量および／またはマーカーの数学的関連性の回帰分析には、さらなる臨床的および／または分子の共変量が含まれる。このような臨床的共変量には、処置レジメン、臨床的結果（例えば、疾患特異的な生存、治療の失敗）、および／または診断後の時間の関数としての臨床的結果、治療の開始後の時間、および／または処置の完了後の時間が含まれるがこれらに限定されない。

【０３１５】

ＶＩＩ．キット

本発明は、代謝性障害または代謝性障害について処置されている被験体の生存を予後診断するための組成物およびキットもまた提供する。これらのキットは以下の１つ以上を含む：本発明のマーカーに特異的に結合する検出可能な抗体、本発明のマーカーに特異的に結合する検出可能な抗体、染色のために被験体の組織試料を入手および／または調製するための試薬、ならびに使用のための説明書。

【０３１６】

本発明のキットは、本発明の方法を実施するために有用なさらなる構成要素を任意に含むことができる。例として、これらのキットは、相補性核酸をアニールするためまたは抗体が特異的に結合するタンパク質との抗体の結合のために適切な流体（例えば、ＳＳＣ緩衝液）、１つ以上の試料成分、本発明の方法の実施を説明する説明書、および組織特異的対照／標準を含んでもよい。

【０３１７】

ＶＩＩＩ．スクリーニングアッセイ

本発明は、本発明のマーカーの発現および／または活性を調節することによって代謝性障害を調節する、調節因子、すなわち、候補または試験化合物または因子（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプトイド、小分子、または他の薬物）を同定するための方法（本明細書では「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる）もまた提供する。このようなアッセイは、典型的には、本発明のマーカーと１種以上のアッセイ成分の間の反応を含む。他の構成要素は、試験化合物自体、または試験化合物および本発明のマーカーの天然結合パートナーの組み合わせのどちらかであり得る。本明細書に記載されるものなどのアッセイを介して同定された化合物は、例えば、代謝性障害を調節するために、例えば、阻害し、緩和し、処置し、または予防するために有用であり得る。

【０３１８】

本発明のスクリーニングアッセイで使用される試験化合物は、天然および／または合成化合物の系統的ライブラリーを含む、いずれの利用可能な供給源からも取得され得る。試験化合物はまた：生物ライブラリー；ペプトイドライブラリー（ペプチドの官能基を有するが、酵素分解の抵抗性であるが、それにもかかわらず生物活性を保持する新規の非ペプチド主鎖を持つ、分子のライブラリー；例えばZuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37：2678－85を参照）；空間的にアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー；逆重畳を必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティクロマトグラフィー選択を使用するライブラリー法を含む、当分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の手法のいずれによっても取得され得る。生物ライブラリーおよびペプトイドライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されているが、他の4つの手法は化合物のペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリーまたは小型分子ライブラリーに適用できる（Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12：145）。

【0319】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当分野において、例えば：DeWitt et al.（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90：6909；Erb et al.（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91：11422；Zuckermann et al.（1994）. J. Med. Chem. 37：2678；Cho et al.（1993） Science 261：1303；Carrell et al.（1994） Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33：2059；Carell et al.（1994） Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33：2061；and in Gallop et al.（1994）J. Med. Chem. 37：1233。

化合物のライブラリーは、溶液中に（例えばHoughten, 1992, Biotechniques 13：412－421）、またはビーズ（Lam, 1991, Nature 354：82－84）、チップ（Fodor, 1993, Nature 364：555－556）、細菌および／もしくは胞子（Ladner, USP 5, 223, 409）、プラスミドの上に（Cull et al, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89：1865－1869）またはファージの上に（Scott and Smith, 1990, Science 249：386－390；Devlin, 1990, Science 249：404－406；Cwirla et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87：6378－6382；Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222：301－310；Ladner、上掲）提供され得る。

【0320】

本発明のスクリーニング方法は、被験体からの生物試料を試験化合物と接触させること、ならびに、試料中の本発明のマーカーの発現および／または活性を調節する試験化合物の能力を決定することを包含する。本発明のマーカーの発現および／または活性は、本明細書に記載されるように決定できる。

【0321】

別の実施形態において、本発明は、本発明のマーカーまたはその生物学的に活性な部分の基質である候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。なお別の実施形態において、本発明は、本発明のマーカーまたはその生物学的に活性な部分に結合する候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。試験化合物がマーカーに直接結合する能力を決定することは、マーカーへの化合物の結合が、複合体中の標識されたマーカー化合物を検出することによって決定できるように、例えば、放射性同位元素または酵素標識と化合物を結合させることによって達成できる。例えば化合物（例えばマーカー基質）に^{131}I、^{125}I、^{35}S、^{14}C、または^{3}Hを直接または間接的のどちらかで標識して、放射性同位体を電波放出の直接カウントによってまたはシンチレーションカウントによって検出することができる。あるいは、アッセイ構

成要素に例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼを酵素標識して、酵素標識を適切な基質の生成物への変換の決定によって検出することができる。

【０３２２】

本発明は、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規薬剤にさらに関する。したがって、適切な動物モデルにおいて本明細書に記載するように同定された薬剤をさらに使用することは、本発明の範囲内である。例えば本明細書に記載するように同定された本発明のマーカーの発現および／または活性を調節することができる薬剤を動物モデルで使用して、このような薬剤を用いた処置の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、本明細書に記載するように同定された薬剤を動物モデルで使用して、このような薬剤の作用機序を決定することができる。さらに、本発明は、上記スクリーニングアッセイによって同定された、上記処置のための新規薬剤の使用に関する。

【０３２３】

本発明は、制限するとして解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例証される。本願を通じて引用されているすべての参考文献ならびに公開された特許および特許出願は、参照により本明細書に組み入れられている。

【実施例】

【０３２４】

本発明は、ここで、一般的に説明されてきたが、当業者が、本明細書の上記の教示および以下の実施例から、他のアッセイ、細胞の種類、薬剤、構築物、またはデータ分析方法が、すべて制限なく、請求された本発明の範囲から逸脱せずに使用できることを認識しているので、単に本発明のある態様および実施形態の例証の目的のために含まれており、本発明を制限する意図するものではない、以下の実施例を参照することによってより容易に理解されるであろう。

【０３２５】

本出願のいずれの箇所で参照されたいずれの特許、特許出願、特許公報、または科学論文の内容も、その全体が本明細書に組み入れられている。

【０３２６】

本発明の実施は、適切な場合および別途指摘しない限り，当業者の技法範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、ウイルス学、組換えＤＮＡ、および免疫学の慣習的な技法を用いるであろう。このような技法は、文献に記載されている。例えばＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．，ｅｄ．ｂｙ Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：２００１）；専門書、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．）；Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ ｂｙ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９９；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｅｄ．ｂｙ Ｂｏｎｉｆａｃｉｎｏ，Ｄａｓｓｏ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｈａｒｆｏｒｄ，およびＹａｍａｄａ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９９；ａｎｄ ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｅｄ．ｂｙ Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２００３を参照。

【０３２７】

実施例１：ＭＩＭとしてのＣｏＱ１０の同定

潜在的なＭＩＭとしてＣｏＱ１０を評価するために、酸化型のＣｏＱ１０を癌株化細胞および正常な対照株化細胞の両方を含む株化細胞のパネルに外部から添加して、パネルの各株化細胞について細胞微小環境プロフィールに誘導された変化を影響評価した。ｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの両方を含む、細胞形態／生理機能に対するおよび細胞組成物に対する変化を、正常細胞との比較として罹患細胞について評価および比較した。

これらの実験結果は、ＣｏＱ１０、および特にＣｏＱ１０の酸化型をＭＩＭとして同定した。

【０３２８】

実験の第１セットでは、細胞形態／生理機能に対する変化をＣｏＱ１０に対する細胞の感受性およびアポトーシス応答を検査することによって評価した。対照株化細胞（ケラチノサイトおよびメラノサイトの初代培養）および複数の皮膚癌株化細胞（ＳＫ－ＭＥＬ－２８、非転移性皮膚黒色腫；ＳＫ－ＭＥＬ－２、転移性皮膚黒色腫；またはＳＣＣ、扁平上皮細胞癌腫；ＰａＣａ２、膵臓癌株化細胞；またはＨＥＰ－Ｇ２、肝臓癌株化細胞）を含む皮膚株化細胞のパネルを各種のレベルのコエンザイムＱ１０によって処置した。これらの実験結果は、癌株化細胞が、対照株化細胞と比較して改変された用量依存性応答を癌細胞のみにおけるアポトーシスおよび細胞死の誘導と共に呈することを証明した。例示的な実験を下の実施例３に詳細に記載する。

【０３２９】

次に、ＣｏＱ１０による処置後に細胞の組成の変化を影響評価するアッセイを用いた。リアルタイムＰＣＲアレイ法を使用して、ｍＲＮＡレベルでの遺伝子発現の変化を分析した。例示的な実験を下の実施例６および９～１３に詳細に記載する。相補的実験において、抗体マイクロアレイ法、２次元ゲル電気泳動、それに続く質量分析キャラクタリゼーションを使用するタンパク質同定（ｉｄｅｎｔｉｆｉｃｕａｔｉｏｎ）を使用することによって、およびウェスタンブロット分析によって、タンパク質レベルでの遺伝子発現の変化を分析した。例示的な実験を下の実施例４、７および８にそれぞれ詳細に記載する。これらのアッセイからの結果は、検査された株化細胞において、遺伝子発現の著しい変化がｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの両方で、酸化型ＣｏＱ１０の添加により誘導されることを証明した。ＣｏＱ１０処置によって調節された遺伝子は、アポトーシス、癌生物学および細胞増殖、解糖および代謝、分子輸送、ならびに細胞シグナル伝達を含む、複数の細胞経路中に密集することが見出された。

【０３３０】

ＣｏＱ１０の細胞中への進入を確認し、細胞中に存在するＣｏＱ１０のレベルおよび型を決定するために実験を行った。特に、ミトコンドリア中に存在するコエンザイムＱ１０のレベル、ならびにＣｏＱ１０の型（すなわち酸化型または還元型）を、ＣｏＱ１０で処置した細胞からのミトコンドリア濃縮調製物を分析することによって決定した。ミトコンドリア中に存在するコエンザイムＱ１０のレベルは、外因性Ｑ１０の添加に伴って、時間および用量依存的な様式で増加することが確認された。驚くべき予想外の結果において、ＣｏＱ１０はミトコンドリア中に主に酸化型で存在することが決定された。加えて、濃縮試料からのタンパク質のレベルの変化を２次元ゲル電気泳動および質量分析キャラクタリゼーションによるタンパク質同定によって分析した。これらの実験からの結果は、検査された時間経過でのミトコンドリア中の酸化型ＣｏＱ１０のレベルが、代謝経路およびアポトーシス経路に関連する特異的タンパク質のｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの調節によって明示されるように、多岐にわたる細胞変化に相関することを証明した。例示的な実験を下の実施例５に詳細に記載する。

【０３３１】

本明細書で出願人らによって記載された結果は、内因性分子ＣｏＱ１０、および特にＣｏＱ１０の酸化型をＭＩＭとして同定した。例えば結果がＣｏＱ１０をＭＩＭとして同定したのは、ＣｏＱ１０がｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの両方での遺伝子発現の変化を誘導することが観察されたためである。結果がＣｏＱ１０が多次元特徴を有するとして同定したのは、ＣｏＱ１０が、正常な（例えば非癌性）状態と比較した疾患状態（例えば癌）において、細胞形態／生理機能および細胞組成物の示差的変化（例えばｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの両方での遺伝子発現の示差的変化）を誘導したためである。その上、結果は、ＣｏＱ１０が細胞に進入することができ、それゆえ治療効果および担体効果の両方を呈するという点で多次元特徴を有するとして同定した。

【０３３２】

実施例２：代謝性障害についての疾患関連プロセスおよびバイオマーカーを同定するための方法

株化細胞が目的の分子によって処置された細胞ベースアッセイから、処置細胞対非処置細胞の相違をｍＲＮＡアレイ、タンパク質抗体アレイ、および２次元ゲル電気泳動によって評価する。比較試料分析からＭＩＭまたはエピシフターによって調節されることが同定されたタンパク質を、経路分析を使用するシステム・バイオロジー・パースペクティブ（Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅ ｕｓｉｎｇ ａｎａｌｙｓｉｓ）（Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ ＩＰＡソフトウェア）および公知の文献の検討から評価した。潜在的な治療ターゲットまたはバイオマーカーターゲットとして同定されたタンパク質に、ウェスタンブロット分析、ｓｉＲＮＡノックダウン、または組換えタンパク質産生およびキャラクタリゼーション方法などの確認アッセイに供する。

【０３３３】

実施例３～８の物質および方法

コエンザイムＱ１０ストック

５００μＭコエンザイムＱ１０（細胞増殖培地中５％イソプロパノール）を以下のように調製した。５００μＭコエンザイムＱ１０ストック１０ｍＬは、毎回更新した。分子量：８６３．３４

（０．０００５ｍｏｌ／Ｌ）（０．０１０Ｌ）（８６３．３４ｇ／ｍｏｌ）＝０．００４３１７ｇ

５００μＭストック１０ｍＬを作製するために、４．３２ｍｇコエンザイムＱ１０を１５ｍＬファルコンチューブに秤量して、イソプロパノール５００μＬを添加した。溶液を完全に溶解するために撹拌しながら、５０～６０℃の水浴で加温した。本溶液に培地９．５ｍＬ（細胞を培養したのと同じ培地）を添加した。

【０３３４】

細胞培養

細胞をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ ＣｏｌｌｅｃｔｉｏｎまたはＧｉｂｃｏから取得した。細胞を５％ウシ胎仔血清、０．２５ｕｇ／ｍＬアンホテリシン、１００ｕｇ／ｍＬストレプトマイシン、および１００ＵｍＬ－１ペニシリンを補足したＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地で培養した。細胞を３７℃の９５％空気および５％ＣＯ２の雰囲気中で維持した。

【０３３５】

コエンザイムＱ１０処置および全タンパク質単離

細胞をＱ１０に曝露する前に８５％コンフルエントまで培養した。補足培地をＱ１０によって５０および１００マイクロモル濃度に調整した。フラスコを対照、５０μＭＱ１０、および１００μＭＱ１０によって３通り処置した。タンパク質を処置フラスコおよび対照フラスコから４、８、１２、および２４時間後に単離した。タンパク質の単離のために、細胞はｐＨ７．４の氷冷ＰＢＳ ５ｍＬによって３回洗浄した。細胞を次にＰＢＳ ３ｍＬ中でこすり取り、遠心分離によってペレット化し、ｐＨ７．４の溶解緩衝液（プロテアーゼ阻害剤およびリン酸阻害剤を含む、８０ｍＭ ＴＲＩＳ－ＨＣｌ、１％ＳＤＳ）に再懸濁させた。ＢＣＡ法を使用してタンパク質濃度を定量した。

【０３３６】

株化細胞

下に挙げる株化細胞を増殖させて、それぞれについて細胞バンクを樹立した。各種のアッセイのための細胞の大規模産生を遂行して、分析のために材料を収集した。一般に、株化細胞の維持に細胞特異的培地が不要であるとき、細胞増殖増殖に使用した培地は５％血清を含むＤＭＥＭＦ－１２であった。細胞は通例、続いての分割ならびに細胞アッセイおよび標準実施方法における使用の前に、７５～８０％コンフルエント（クリアスペーシング（ｃｌｅａｒ ｓｐａｃｉｎｇ））まで増殖させた。実験のために以下の株化細胞を樹立した：

ＳＫ－ＭＥＬ－２８（非転移性皮膚黒色腫）

ＳＫ－ＭＥＬ－２（転移性皮膚黒色腫）
ＨＥＫａ（ケラチノサイト、皮膚対照）
ＨＥＭａ（メラノサイト、皮膚対照）
ｎＦＩＢ（新生児線維芽細胞）
ＨＥＰ－Ｇ２（肝臓癌）［ＳＢＨ株化細胞］
ＳｋＢｒ－３（乳癌、Ｈｅｒ２過剰発現）
ＭＣＦ－７（乳癌、ｐ５３突然変異）
ＰＣ－３（前立腺癌）［ＳＢＨ株化細胞］
ＳｋＢｒ－３（ヒト乳腺癌）
ＮＣＩ－ＥＳ－０８０８
ＳＣＣ（扁平上皮細胞癌腫）
ＰａＣａ－２
ＮＩＨ－３Ｔ３

細胞培養：

細胞をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ ＣｏｌｌｅｃｔｉｏｎまたはＧｉｂｃｏから取得した。細胞を５％ウシ胎仔血清、０．２５ｕｇ／ｍＬアンホテリシン、１００ｕｇ／ｍＬストレプトマイシン、および１００ＵｍＬ－１ペニシリンを補足したＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地で培養した。細胞を３７℃の９５％空気および５％ＣＯ２の雰囲気中で維持した。

【０３３７】

皮膚悪性黒色腫ＳＫ－ＭＥＬ２８細胞を５％ＦＢＳ、アンホテリシンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを補足したグルタマックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）を含むＤＭＥＭ／Ｆ１２中で培養および維持した。細胞を３７℃にて５％ＣＯ２によって増殖させた。追加の株化細胞および成長条件の詳細事項を下の表で概説する。

【表１】

表１ Ｑ１０に対する感受性について分析された株化細胞

株化細胞	内容	培養条件
ＰａＣａ２	膵臓癌腫	グルタマックス＋１０％ＦＢＳ、２．５％ウマ血清、アンホテリシン、ペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEM／Ｆ１２
ＨｅｐＧ２	肝細胞癌腫	１０％ＦＢＳ、アンホテリシン、ペニシリン／ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を補足した、アール塩を含むMEM
ＰＣ３	前立腺癌	５％ＦＢＳ、アンホテリシンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを補足した、グルタマックスを含むDMEM／Ｆ１２
ＳＫＢｒ３	乳癌	５％ＦＢＳおよびアンホテリシン、ペニシリン／ストレプトマイシンを補足した、グルタマックスを含むDMEM／Ｆ１２
ＭＣＦ－７	乳癌	５％ＦＢＳおよびアンホテリシン、ペニシリン／ストレプトマイシンを補足した、グルタマックスを含むDMEM／Ｆ１２

【０３３８】

ＳＫＭＥＬ２８細胞のＱ１０処置：

ＳＫ－ＭＥＬ２８細胞を１００μＭ Ｑ１０または対照ビヒクルによって処置した。Ｑ１０の製剤は以下の通りである。１５ｍＬキャップ付きチューブに、Ｑ１０ ４．３２ｍｇ（Ｃｙｔｏｔｅｃｈより供給）を移し、次にイソプロパノール５００μｌの添加により溶解させた。得られた溶液を６５℃の水浴で加温して、高速でボルテックスした。Ｑ１０／イソプロパノール溶液の体積を平衡にした細胞培養培地の添加により、１０ｍＬにした。ストック溶液を次にボルテックスして、Ｑ１０の溶解性を最大にした。ストック溶液を希釈して（培地８ｍＬによりストック２ｍＬ）１００μ ＭＱ１０の最終濃度を取得した。対照ビヒクルでは、培地９．５ｍＬをイソプロパノール５００μＬに添加した。対照ストック（ストック２ｍＬ）を培地８ｍＬでさらに希釈した。細胞を処置開始の６、１６、２４、４８または７２時間後に収集した。

【０３３９】
ＳＣＣ細胞のＱ１０処置：
ＳＣＣ細胞を１００μＭ　Ｑ１０（上記のように調製）によって６時間または２４時間のどちらかで処置した。対照細胞は未処置細胞であった。処置後、各種の時間にて収集およびペレット化して、ペレットを急速凍結させ、ＲＮＡを下記のようにＸＴＡＬにて単離するまで－８０℃にて貯蔵した。
【０３４０】
ＲＮＡ単離：
ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｖａｌｅｎｃｉａ　ＣＡ）キットをメーカーの説明書に従って使用して、細胞を各種の処置時間にＲＮＡ単離のために溶解させた。ＲＮＡを２６０ｎｍにおける光学密度を測定することによって定量した。
【０３４１】
第１鎖合成：
第１鎖ｃＤＮＡを、ＲＴ２第１鎖合成キット（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．，Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＲ）をメーカーの推奨に従って使用して、全ＲＮＡ　１μｇから合成した。
【０３４２】
リアルタイムＰＣＲ：
第１鎖合成からの生成物を水で希釈して、ＳＹＢＲグリーン・マスター・ミックス（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．，Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＤ）と混合し、ＰＣＲアレイ上に添加した。リアルタイムＰＣＲをＢｉｏｒａｄ　ＣＦＸ９６でＰＣＲアレイ（アポトーシスアレイ、糖尿病アレイ、酸化ストレスアレイおよび抗酸化防御アレイならびに熱ショックタンパク質アレイ）（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＤ）に対して実行した。
【０３４３】
アポトーシスのためのネキシンアッセイによる、コエンザイムＱ１０に対する株化細胞感受性の決定：
早期および後期アポトーシスでの細胞のパーセンテージをコエンザイムＱ１０処置の２４時間後に定量した。早期および後期アポトーシスを、コエンザイムＱ１０に対する各種の癌株化細胞の感受性の相違を理解するためのマーカーとして使用した。試験した各種の株化細胞は、ＰａＣａ２、ＨｅｐＧ２、ＰＣ－３、ＳＫＢｒ３、ＭＣＦ－７およびＳＫ－ＭＥＬ２８であった。細胞を９６ウェルプレート内で一晩接着させた。これらの細胞を対照ビヒクル、５０μＭ　Ｑ１０または１００μＭコエンザイムＱ１０のいずれかによって処置した。２４時間後、アポトーシス細胞の存在がＰＣＡ９６フローサイトメータ（Ｇｕａｖａ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ）で推定された。加えていくつかの細胞を、アポトーシスの正の対照としての４μＭスタウロスポリンで２時間処置した。細胞を最初にＰＢＳで洗浄して、Ａｃｃｕｍａｘ（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）５０μＬによって室温にて剥離させた。１％プルロニックＦ－６８（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を含有する培養培地の添加によって、解離を停止させた。ネキシン試薬１００μＬ（Ｇｕａｖａ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ）を各ウェルに添加した。暗所での２０分間のインキュベーションの後、アッセイを低結合プレートにて遂行して、細胞の基質への再結合を最小限に抑えた。ネキシン試薬は２種類の染料を含有している。アネキシン－Ｖ－ＰＥは、早期アポトーシス細胞の特徴である、ホスファチジル（ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌ）セリンを細胞の外部にて検出する。第２の染料７－ＡＡＤは、生（健常）および早期アポトーシス細胞から排除されるが、後期アポトーシス細胞のみに浸透する。４つの細胞集団；生、早期アポトーシス細胞、後期アポトーシスおよび破片のパーセンテージは、Ｃｙｔｏｓｏｆｔ　２．５．７ソフトウェア（Ｇｕａｖａ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ）を使用して決定した。
【０３４４】

免疫ブロッティング

試料当りおよそ５０μｇのタンパク質を、免疫ブロッティングによってアッセイした。すべての処置は対照を用いて３通り実行した。タンパク質を１２％ＴＲＩＳ－ＨＣｌゲル上で分離し、電気泳動を介してニトロセルロース膜に移し、１次抗体によるインキュベーションの前に５％牛乳およびＴＢＳＴ溶液を使用して遮断した。１次抗体を５％ＢＳＡおよびＴＢＳＴ溶液中４℃にて一晩インキュベートした。２次抗体を４℃にて１時間インキュベートした。すべての抗体をＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入した。抗体は、１：５０００の比のβアクチンを除いて、１：１０００の比で使用した。ブロットを展開させて、結果はＮＩＨ Ｊａｖａベースの濃度計分析ソフトウェアＩｍａｇｅ Ｊを使用して定量した。すべてのブロットはプローブも行い、そのそれぞれのβアクチン発現に正規化した。

【０３４５】

２次元電気泳動

等電点電気泳動（ＩＥＦ）の前に、試料を４０ｍＭ Ｔｒｉｓ、７Ｍ尿素、２Ｍチオ尿素、および１％Ｃ７両性イオン洗剤中に溶解させて、トリブチルホスフィンによって還元し、１０ｍＭアクリルアミドによって室温にて９０分間アルキル化した。試料を１０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａデバイスに通した後、７Ｍ尿素、２Ｍチオ尿素、および２％ ＣＨＡＰＳから成る少なくとも３倍量の再懸濁緩衝液によって、試料の伝導率を低下させる。タンパク質１００マイクログラムに、１１ｃｍ ｐＨ３～１０、ｐＨ４～７またはｐＨ６～１１の固定化ｐＨ勾配ストリップ（ＧＥ，Ａｍｅｒｓｈａｍ、ＵＳＡ）にて１００，０００ボルト時までＩＥＦに供した。ＩＥＦの後、固定化ｐＨ勾配ストリップを６Ｍ尿素、２％ＳＤＳ、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ酢酸緩衝液、ｐＨ７．０、および０．０１％ブロムフェノールブルー中で平衡にして、８～１６％Ｔｒｉｓ－ＨＣｌプレキャストゲル１ｍｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＵＳＡ）でＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルは２通り実行した。これらにどちらも固定、ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ、８０ｍＬ／ゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＳＡ）での染色およびＦｕｊｉ ＦＬＡ－５１００レーザスキャナでの撮像、またはＰＶＤＦ膜上への移動を行った。

【０３４６】

対照試料についての追加の情報を取得して、ｄＰＣ（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｆｏｒｅｓｔ Ｉｎｃ．）選択的ｐＩ分画、それに続くｄＰＣプラグのトリプシン消化を質量分析同定および半定量（ｓｅｍｉ－ｑｕａｎｔｉｚａｔｉｏｎ）（ＮａｎｏｍａｔｅまたはＬＣ／ＬＴＱ／ＭＳ）と共に利用する方法を使用して、タンパク質同定の有用性を試験した。対照試料を用いて遂行したｄＰＣ分析は、タンパク質の大型サブセットの同定でその有用性を証明した。試験の間に産生された材料は、将来、必要が生じた場合に資源として利用され得るように保存した。

【０３４７】

２次元ゲル画像分析：

すべてのゲル画像の分析は、Ｐｒｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ Ｐｒｏ（Ｎｏｎｌｉｎｅａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗｃａｓｔｌｅ ｕｐｏｎ Ｔｙｎｅ、英国）を使用して遂行した。スポット検出、マッチング、バックグラウンド除去、正規化、およびフィルタリングの後、ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙゲル画像のデータをエクスポートした。Ｐｒｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙでスチューデントのｔ検定を使用して群間の対比較を遂行し、発現が著しく改変されたスポットを同定した（ｐ＞０．０５）。

【０３４８】

抗体アレイ：

抗体マイクロアレイ（Ｐａｎｏｒａｍａ ＸＰ７２５抗体アレイ、Ｓｉｇｍａ）を利用して７００超のタンパク質抗体をスクリーニングし、Ｑ１０処置細胞（ＳＫ－ＭＥＬ－２８、ＳＣＣ）におけるタンパク質濃度レベルの変化を影響評価した。細胞抽出物におけるタンパク質の発現は、スライド上にスポットされた対応する抗体にタンパク質が結合され

たときに検出される。結合の前に、タンパク質を蛍光描出および定量的分析に使用される蛍光染料で直接標識する。アレイを異なるＣｙＤｙｅ（Ｃｙ３またはＣｙ５）によってそれぞれ標識された２つの試料のタンパク質発現プロフィールを比較するために使用して（試験試料対参照試料）、２つの試料を等しいタンパク質濃度でアレイ上に同時に適用する。次に各試料の蛍光シグナル強度を試料の染料標識に対応する波長にて個別に記録して、比較する。

【０３４９】

高用量のコエンザイムＱ１０は、培養されたＳＫＭＥＬ－２８細胞のアポトーシス経路、糖尿病経路および酸化ストレス経路に関与する遺伝子の発現を調節する。

【０３５０】

実験詳細事項：５％　ＦＢＳ、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびアンホテリシンを補足した、グルタマックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　カタログ番号１０５６５－０４２）を含有するＤＭＥＭ－Ｆ１２中で培養されたＳＫＭＥＬ－２８細胞（ＡＴＣＣ　カタログ番号ＨＴＢ－７２）は、非転移性、皮膚黒色腫細胞であり、ビヒクルまたは１００ｕＭコエンザイムＱ１０によって各種の長さの時間にわたって処置した。コエンザイムＱ１０処置の結果として生じる遺伝子発現のいずれの変化も、リアルタイムＰＣＲアレイ（アポトーシスカタログ番号ＰＡＨＳ－１２、糖尿病カタログ番号ＰＡＨＳ－０２３および酸化ストレスカタログ番号ＰＡＨＳ－０６５）（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ、ＭＤ）を使用して定量した。

【０３５１】

５００ｕＭコエンザイムＱ１０のストック濃縮物を、イソプロパノール５００ｕｌ中に４．３２ｍｇを溶解することによって調製して、これを培地の添加により１０ｍｌまでさらに希釈した。ボルテックスおよび６５℃までの加熱を交互に行って、コエンザイムＱ１０を溶解させた。ストック溶液２ｍｌを培地により１０ｍｌに希釈して、１００ｕＭ　Ｑ１０含有培地を得て、これを細胞の処置に使用した。コエンザイムＱ１０を添加しないことを除いた類似のプロトコルによって、ビヒクルを並行して調製した。

【０３５２】

ＳＫＭＥＬ－２８細胞を６ウェルプレートにて1×10^5細胞／ウェルの密度で播種した。２４時間後、細胞が結合して５０％コンフルエントであるときに、ビヒクルまたは１００ｕＭ　Ｑ１０のどちらかを添加した。細胞をＱ１０処置の６、１６、２４、４８または７２時間後に収集したが、ビヒクル処置細胞は２４時間後に収集した。スピンカラムおよびオンカラムＤＮＡーゼ処置を用い、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｖａｌｅｎｃｉａ　ＣＡ　カタログ番号７４１０４）キットをメーカーの説明書に従って使用して、細胞を各種の処置時間にＲＮＡ単離のために溶解させた。２６０ｎｍにおける吸光度を測定することによってＲＮＡを定量した。

【０３５３】

リアルタイムＰＣＲの前に、全ＲＮＡ　０．４～１ｕｇをテンプレートとして使用する第１鎖ｃＤＮＡ合成を、ゲノムＤＮＡ消失ステップを用いるＲＴ２第１鎖合成キット（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．，Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ、ＭＤ、カタログ番号Ｃ－０３）をメーカーの推奨に従って用いて行った。第１鎖合成からの生成物を水で希釈して、ＳＹＢＲグリーン・マスター・ミックス（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．，Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＤ、カタログ番号ＰＡ－０１０－１２）と混合し、共通経路内で連結された８４種類の異なる遺伝子、正規化に使用される５種類のハウスキーピング遺伝子、逆転写およびＰＣＲ対照を含有するＰＣＲアレイ上に添加した。リアルタイムＰＣＲをＢｉｏｒａｄ　Ｃｆｘ９６に対して実行した。酵素を活性化させるホットスタートによって増幅を開始し、それぞれ（９５℃－１５秒変性ステップおよび６０℃－１分アニーリングおよび伸長ステップ）の４０サイクルがに続き、溶融曲線プログラムが続いた。Ｃｔ値（全ての処置群についてのＰＣＲサーモサイクラーによる出力）をエクセルシートにまとめ、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓａｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．ｃｏｍ／ｐｃｒ／ａｒｒａｙａｎａｌｙｓｉｓ．ｐｈｐ．で入手できる比較分析ソフトウェアにロードした。

【０３５４】
ミトコンドリア濃縮試料の精製：
実験詳細事項：１００μＭ　Ｑ１０によって２４または４８時間処置されたＳＫＭＥＬ－２８細胞、ＮＣＩ－ＥＳ０８０８細胞およびＮＩＨ－３Ｔ３細胞を、ｔ＝０にて収集された細胞と共に、Ｔ１６０フラスコから洗浄およびこすり落としによって収集した。細胞を遠心分離して、ペレット化し、急速凍結させ、ミトコンドリアが単離されるまで－８０℃にて貯蔵した。細胞ペレットを解凍して、再懸濁させ、ダウンスホモジナイザで破砕した。ホモジネートを遠心分離して、培養細胞用ミトコンドリア単離キット（Ｍｉｔｏｃｈｏｎｄｒｉａ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｋｉｔ　ｆｏｒ　Ｃｕｌｔｕｒｅｄ　ｃｅｌｌｓ）（ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ　ＯＲ、カタログ番号ＭＳ８５２）によって推奨された試薬およびプロトコルを使用してミトコンドリアを単離した。ミトコンドリア画分をアリコートし、－８０℃で保存した。

【０３５５】
コエンザイムＱ１０およびユビキノール－１０の定量方法：
コエンザイムＱ１０（Ｑ１０）および還元型ユビキノール－１０（Ｑ１０Ｈ２）の同時決定の方法は、最近公開された方法（Ｒｕｉｚ－Ｊｉｍｅｎｅｚ，２００７，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ａ，１１７５，２４２－２４８）に基づいて、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを陽イオンモードエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）と共に使用することによって行った。Ｑ１０およびＱ１０Ｈ２の両方の高選択的同定および高感受性定量は、他の選択された脂質の同定と共に可能である。１００μＭ　Ｑ１０によって処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８からのミトコンドリア濃縮試料の一定分量に、タンパク質沈殿（１－プロパノール３００μｌ中で超音波処理された充填細胞１００μｌ）、液液抽出（上清に水１００μｌを添加して、Ｘ３をｎ－ヘキサン２００μｌで抽出する）、合せたヘキサン抽出物の蒸発乾固および９５：５　メタノール／ヘキサン（ｖ／ｖ）５０μｌでの再構成に基づく、慣習的な前処置に供した。分析は、Ｐｒｉｓｍ　ＲＰ　１×１００ｍｍ、５μｍ粒径カラムを備えたＷａｔｅｒｓ　Ｑｕａｔｔｒｏ　ＩＩ　３連４重極質量分析計（Ｋｅｙｓｔｏｎｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）でのＬＣ－ＭＳ／ＭＳによった。流速５０μｌ／分での２０％イソプロピルアルコール８０％メタノール中の４ｍＭギ酸アンモニウムによる定組成溶離。各試料１０μｌを注入した。ＭＲＭ分析は、ｍ／ｚ８８２．７＞１９７．００（Ｑ１０Ｈ２）およびｍ／ｚ８８０．８０＞１９７．００（Ｑ１０）トランジションをコーン電圧４０および衝突エネルギー３０と共に使用して遂行した。

【０３５６】
実施例３：ＣｏＱ１０に対する株化細胞の感受性
いくつかの株化細胞のＱ１０に対する感受性を、適用の２４時間後に２種類の染料、７ＡＡＤおよびアネキシン－Ｖ－ＰＥの組み合わせを含有する試薬（ネキシン試薬）を使用することによって試験した。７ＡＡＤ染料は、透過性細胞膜によって細胞；主に後期アポトーシスにある細胞の中に進入するであろう。アネキシン－Ｖ－ＰＥは、早期アポトーシス細胞の原形質膜の外面に露出されたホスファチジル（Ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌ）セリンに結合する染料である。それゆえネキシン試薬を使用して、フローサイトメータでアポトーシス細胞の異なる集団を区別することができる。

【０３５７】
ＰａＣａ２細胞は、５０μＭ　Ｑ１０および１００μＭ　Ｑ１０によりＱ１０適用の２４時間後に、早期および後期アポトーシス細胞の両方で上昇を示した（ゲート細胞の５～１０％の間）。ＰＣ－３細胞も、５０μＭおよび１００μＭ　Ｑ１０によって早期および後期アポトーシス集団で上昇を示したが、上昇はＰａＣａ２細胞と比較して小さかった。ＭＣＦ－７およびＳＫ－ＭＥＬ２８細胞は５０μＭおよび１００μＭ　Ｑ１０によって、早期アポトーシス集団のみで上昇を示した。ＨｅｐＧ２細胞も５０μＭ　Ｑ１０処置に感受性であり、後期アポトーシスステージおよび早期アポトーシスステージに集まったゲート細胞の約２０％の上昇があった。ＳＫＢｒ３は、５０μＭまたは１００μＭ　Ｑ１０処置のどちらによっても早期および後期アポトーシスで大きな上昇を少しも示さなかった、

試験した中で唯一の株化細胞であった。結果を図１～６に示す。

【０３５８】

Ｑ１０処置がＨｅｐＧ２肝臓癌細胞でアポトーシス応答を引き起こすことをさらに確認するために、第２のアポトーシスアッセイを単鎖ＤＮＡを測定するＡｐｏＳｔｒａｎｄ（商標）ＥＬＩＳＡベース法を使用して評価した。ＡｐｏＳｔｒａｎｄ（商標）ＥＬＩＳＡは、アポトーシス細胞中のＤＮＡのホルムアミド変性に対する感受性および単鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）に対するモノクローナル抗体による変性ＤＮＡの検出に基づく。肝臓癌株化細胞ＨｅｐＧ２の５０および１００μＭ　Ｑ１０による処置は、それぞれ１７％および３２％の用量応答で検出可能なアポトーシスを生じた（図７）。これらの結果は、他の組織からの他の癌株化細胞（例えばＳＣＣ、ＳＫＭＥＬ－２８、ＭＣＦ－７、およびＰＣ－３）においてアポトーシスを誘導するＱ１０の観察結果と一致する。

【０３５９】

実施例４：Ｑ１０によって処置した細胞のプロテオミクス分析

Ｑ１０によって処置した試料の細胞ペレットをプロテオミクス法によって分析した。細胞ペレットを溶解させて、２次元ゲルおよびウェスタンブロット分析で使用するために処置した。３つの細胞タイプ（ＳＫＭＥＬ－２８、ＳＣＣ、およびｎＦｉｂ）をＱ１０によって処置して、２次元ゲル電気泳動によるプロテオミクスキャラクタリゼーションに供した。

【０３６０】

Ｑ１０によって処置したＳＫＭＥＬ－２８細胞のプロテオミクス分析

ウェスタンブロットおよび２次元ゲル電気泳動によって処理および評価された第１の実験セットは、皮膚癌株化細胞ＳＫＭＥＬ－２８であった。本実験セットは、０、５０または１００μＭ　Ｑ１０によって３、６、１２、および２４時間処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞を包含していた。

【０３６１】

Ｑ１０処置ＳＫ－ＭＥＬ－２８試料のセットに、２次元ゲル電気泳動に供して（図８）、対照試料に対するタンパク質レベルの変化を同定するために分析した。すべての２４時間ゲルにわたる９４３スポットの比較分析を遂行して、対照試料を処置試料すべてに対して比較した。分析は、上昇、低下、または翻訳後修飾による、時間経過にわたるスポット変化の同定を含んでいた。

【０３６２】

分析は、３２の統計的に有意な示差的スポット変化を見出した。これより、２０個の非冗長性スポットを切除して、トリプシン消化によるタンパク質同定および質量分析キャラクタリゼーションに供した。キャラクタリゼーションされたペプチドをＭａｓｃｏｔ　ａｎｄ　ＭＳＲＡＴソフトウェア分析を用いてタンパク質データベースで検索して、タンパク質を同定した（表２）。

【表２】

表２　ＳＫＭＥＬ－２８細胞におけるＱ１０処置に対して示差的応答を有することが同定されたタンパク質

時間（時）	Ｑ１０濃度（ｕＭ）	２次元スポット数	発現	差	タンパク質	名称	種類
3	50	528	低下	1．234	カテプシンD	CTSD	ペプチダーゼ
3	50	702	低下	1．575	TCP1含有シャペロニン、サブユニット3	CCT3	その他
3	50	74	低下	1．383	真核生物翻訳開始因子3	EIF3G	翻訳調節因子
3	50	829	低下	1．074	リボソームタンパク質P2	RPLP2	その他
3	50	368	低下	1．121	トランスアルドラーゼ1	TALDO1	酵素
6	50	452	上昇	－1．464	真核生物翻訳開始因子6	EIF6	翻訳調節因子
6	50	175	上昇	－1．32	ストマチン；HSPC322	STOM	その他
6	50	827	上昇	－1．457	チロシン3／トリプトファン5－モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質	YWHAZ	酵素
6	50	139	上昇	－1．628	ビメンチン	VIM	その他
6	50	218	上昇	－1．416	ビメンチン	VIM	その他
6	50	218	上昇	－1．212	ビメンチン	VIM	その他
6	50	139	上昇	－1．036	ビメンチン	VIM	その他
6	50	507	低下	1．379	ラミンB1	LMNB1	その他
6	50	571	低下	1．832	ミトコンドリアインポート受容体Tom22	TOMM22	トランスポーター
12	50	166	上昇	－1．171	ALG－2共役タンパク質1	PDCD6IP	その他
12	50	550	上昇	－1．747	ペプチジルプロリルイソメラーゼ　A	PPIA	酵素
12	50	613	低下	1．802	ガレクチン－1	LGALS1	その他
12	50	242	低下	1．373	ホスホグリセリン酸ムターゼ；ホスホマンノムターゼ2	PGAM2	ホスファターゼ
24	50	326	低下	1．385	グリシルーｔRNAシンターゼ	GARS	酵素
24	50	419	低下	1．451	マゴーナシホモログ	MAGOH	その他
3	100	528	低下	－1．036	カテプシンD	CTSD	ペプチダーゼ
3	100	702	低下	1．151	TCP1含有シャペロニン、サブユニット3	CCT3	その他
3	100	74	低下	1．122	真核生物翻訳開始因子3	EIF3G	翻訳調節因子
3	100	829	低下	1．145	リボソームタンパク質P2	RPLP2	その他
3	100	368	低下	1．209	トランスアルドラーゼ1	TALDO1	酵素
6	100	139	上昇	－1．829	ビメンチン	VIM	その他
6	100	218	上昇	－1．761	ビメンチン	VIM	その他
6	100	452	低下	1．134	真核生物翻訳開始因子6	EIF6	翻訳調節因子
6	100	252	低下	1．4	Ｓｅｃ　１３タンパク質、ケラチンＩＩ	?	
6	100	827	低下	1．12	チロシン3／トリプトファン5－モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質	YWHAZ	酵素
12	100	76	上昇	－1．679	ガレクチン－１；ケラチンＩＩ	LGALS1	その他

【０３６３】

本実験の主要な発見は、トランスアルドラーゼ１の減少であり、このことはＱ１０が癌細胞内の代謝状態を改変することにより作用するという前提を裏付けた。トランスアルドラーゼ１は、ペントースリン酸経路（ヘキソースモノリン酸分路としても公知）中の酵素である。トランスアルドラーゼ（ＥＣ：２．２．１．２）は、３炭素ケトールユニットのセドヘプツロース７－リン酸からグリセルアルデヒド３－リン酸への可逆的移動を触媒して、エリトロース４－リン酸およびフルクトース６－リン酸を形成する。本酵素は、トランスケトラーゼと共に、解糖経路とペントース－リン酸経路との間に連結を提供する。このことはヌクレオチドおよびＮＡＤＰＨ合成に関連しており、生合成反応のための還元等価物の産生および還元環境の維持を容易にする。

【０３６４】

最近の刊行物（Ｂａｓｔａ，Ｐ．，ｅｔ．ａｌ．Ａｕｇｕｓｔ　２００８，Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｅｔｅｃｔ　Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ，３２，２００－２０８）は、トランスアルドラーゼにおける遺伝的多型の証拠を提供し、頭部および頸部の扁平上皮細胞癌腫に結び付けられた。最近の別の刊行物（Ｑｉａｎ，Ｙ．，ｅｔ．ａｌ．Ｍａｙ　２００８，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ，４１５，１２３－１３４）は、ミトコンドリアホメオスタシスのモジュレーターとしてのトランスアルドラーゼの欠乏、Ｃａ２＋流入およびアポトーシスを同定した。

【０３６５】

これらの初期の結果から、ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞中でＱ１０によって調節されている

ような、２次元ゲル電気泳動によって同定された残りのタンパク質を公知の関係について分析した（図９）。これらのタンパク質の機能性評価は、１４－３－３－媒介シグナル伝達に関与する群（ＰＤＣＰ６ＩＰ、ＹＷＨＡＺ、およびＶＩＭ）が、多種多様のプロセス［細胞周期；ペントースリン酸経路（ＴＡＬＤＯ１）；セラミドシグナル伝達（ＣＴＳＤ）；アミノアシル－ｔＲＮＡ生合成（ＧＡＲＳ）、およびミトコンドリアタンパク質インポート（ＴＯＭ２２）］に結び付けられた個別のタンパク質と共にあることを明らかにした。

【０３６６】

Ｑ１０によって処置したＳＣＣ細胞のプロテオミクス分析

別の皮膚癌株化細胞の扁平上皮細胞癌腫（ＳＣＣ）も調製して、前のＳＫ－ＭＥＬ－２８分析の追跡実験として、２次元ゲル電気泳動によって分析した。ＳＣＣ細胞を１００μＭ　Ｑ１０によって、収集前に６時間または２４時間処置した。未処置細胞の対照も収集した。細胞ペレットを溶解させ、試料に２次元電気泳動に供した（２通り）。比較試験での６００個を超えるタンパク質スポットの分析を遂行して、対照試料を６時間および２４時間処置に対して比較した。

【０３６７】

上位２５の統計的に有意な示差的スポット変化を２次元電気泳動ゲルの比較分析から評価した。これより、２０個のスポットを切除して、トリプシン消化による同定および質量分析キャラクタリゼーションに供した（結果を下の表３にまとめる）。

【表３】

表３　６および２４時間にてＳＣＣ細胞中で１００μＭ　Ｑ１０処置に示差的応答を有することが同定されたタンパク質

スポット数	タンパク質	名称	細胞局在	機能	応答（倍率変化）
３３１	トランスアルドラーゼ１	ＴＡＬＤＯ１	細胞質	酵素	６および１４時間にて低下（１．５）
２３	ヒトＢＳＣｖ（染色体２０読み枠３）	Ｃ２０ＯＲＦ３	原形質膜	ストリクトシジンシンターゼ	６および２４時間にて低下（２．１）
５４	ＮＭ２３タンパク質	ＮＭＥ１	核、（ミトコンドリア？）	キナーゼ	６時間にて上昇（－１．２）、２４時間にて低下
１１６	ＭＣＦ７乳癌株化細胞からの２つのヒトＥＳＴ（ＨＳＰ７０）			ＨＳＰ７０	６時間にて低下（２．６）、２４時間にてさらに低下
１７６	熱ショック２７ｋＤａタンパク質１	ＨＳＰＢ１	細胞質	環境ストレスに対する応答	６および２４時間にて上昇（－１．９）
１３５	ケラチンＩ	ＫＲＴ１	細胞質	中間フィラメント	６および２４時間にて低下（２．３）
５０	ケラチン１４	ＫＲＴ１４	細胞質	中間フィラメント	６および２４時間にて上昇（－１．６）
６８	ケラチン１３	ＫＲＴ１３	細胞質	中間フィラメント	６および２４時間にて上昇（－１．５）
４９	プロテアソームベータ７	ＰＳＭＢ７	細胞質	プロテアソームサブユニット	２４時間にてのみ低下（１．６）
９３	プロテアソーム・アクチベーター・サブユニット３	ＰＳＭＥ３	細胞質	ペプチダーゼ	２４時間にてのみ低下（１．３）
６６	Ｒｈｏ　ＧＤＰ解離阻害剤（ＧＤＩ）アルファ	ＡＲＨＧＤＩＡ	細胞質	阻害剤	６時間にてのみ低下（１．５）
１	不明？				低下（９．５）

【０３６８】
トランスアルドラーゼ１：Ｑ１０で処置したＳＫＭＥＬ－２８細胞で先に観察されたように、酵素トランスアルドラーゼ１はレベルの低下によって調節された。これは、Ｑ１０とトランスアルドラーゼの改変（およびそれゆえ細胞の代謝状態）との連関についての以前の観察結果を独立して確証するものである。
【０３６９】
トランスアルドラーゼは、ペントースリン酸経路の非酸化的段階における酵素である（図１０）。ペントースリン酸経路は、還元的生合成のためのニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（還元型ＮＡＤＨ）の発生のための細胞の代謝状態において、ならびにＡＴＰ、ＤＮＡ、およびＲＮＡの必須構成要素であるリボースの形成において重要である。トランスアルドラーゼはまた、ペントースリン酸経路を解糖に連結する。解糖は、酸化的リン酸化のミトコンドリアプロセスが利用されないため、癌細胞が細胞生存に必要なエネルギーを取得する代謝経路である。Ｑ１０は、酸化的リン酸化およびミトコンドリアＡＴＰ産生に必要とされる必須のコエンザイム因子である。
【０３７０】
ＢＳＣｖ：スポット２３は、ＢＳＣｖという名称の、染色体２０からの新規ヒトタンパク質であった。ＢＳＣｖタンパク質は、脂肪細胞血漿膜結合型タンパク質（遺伝子名：ＡＰＭＡＰまたはＣ２０ｏｒｆ３）としても公知であり、タンパク質のストリクトシジン・シンターゼ・ファミリーに配列類似性を有するシングルパスＩＩ型膜タンパク質であることが予測されている。Ｑ１０処置は、本タンパク質のレベルの低下を引き起こした。本タンパク質は、十分に特徴付けもされておらず、ストリクトシジンシンターゼとのその相同性も確認されてもいない。興味深いことに、本タンパク質は脂肪細胞分化の役割に関連してきた（Ａｌｂｒｅｋｔｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ヒト大網脂肪組織の最近のプロテオミクス研究はＢＳＣｖを、病的肥満女性による多嚢胞性（ｐｏｌｃｙｓｔｉｃ）卵巣症候群（ＰＣＯＳ）の差次的発現を有する９種類のタンパク質のうちの１つとして同定した（Ｃｏｒｔｏｎ，２００８　Ｈｕｍ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：６５１－６６１に概説されている）。Ｑ１０に応答する細胞表面タンパク質としてのＢＳＣｖに対する抗体は、バイオマーカーとして有用であろう。現在の結果および入手可能な文献に基づいて、ＢＳＣｖは癌および糖尿病で潜在的な役割を有し得る。
【０３７１】
ＮＭ２３Ａ：非転移性細胞１タンパク質（ＮＭ２３Ａ、ＮＭＥ１としても公知）は、転移サプレッサーとであると考えられる。本遺伝子（ＮＭＥ１）は、高転移性細胞におけるその低下したｍＲＮＡ転写レベルのために同定された。該タンパク質は、ヌクレオシド２リン酸キナーゼ（ＮＤＫ）としての活性を有し、「Ａ」アイソフォーム（本遺伝子によりコードされた）および「Ｂ」アイソフォーム（ＮＭＥ２によりコードされた）で構成されたヘキサマーとして存在する。本遺伝子における突然変異は、侵襲性神経芽細胞腫において同定されている。ＮＤＫ活性は、例えばクエン酸（クレブス）回路で産生されたＧＴＰがＡＴＰに変換されるときなどに、異なるヌクレオシド３リン酸の濃度の間で平衡を維持する。ＮＤＫ複合体は、ＳＴＲＡＰとの相互作用を通じてｐ５３に関連している。ＳＴＲＡＰがＨＮＦ４Ａに連結されていることは注目に値する。それゆえＮＭ２３Ａは、細胞制御および疾患処置に重要な経路に関与する潜在的タンパク質である。
【０３７２】
Ｒｈｏ　ＧＤＰ解離阻害剤（ＧＤＩ）アルファ：ＧＤＩは、ＲｈｏタンパクからのＧＤＰの解離、および続いてのＲｈｏタンパク質へのＧＴＰの結合を阻害することによって、ＲｈｏタンパクのＧＤＰ／ＧＴＰ交換反応を調節する。該タンパク質は、癌細胞において上方調節される。
【０３７３】
実施例５：ミトコンドリア濃縮分析
複数の一連の証拠は、ミトコンドリアタンパク質の役割および癌生物学およびＱ１０応答のより綿密な評価が正当化されることを示唆した。第１に、正常細胞におけるエネルギ

ー産生のためのミトコンドリア酸化的リン酸化プロセスには、Ｑ１０の不可欠の役割がある。しかし、癌細胞に出現するのは、Ｑ１０を必要としない解糖の代わりの経路によるエネルギー産生への代謝シフトである。第２に、細胞のアポトーシス応答は、ミトコンドリアタンパク質の出現を必要とする。Ｑ１０は、癌細胞における刺激アポトーシスとして樹立されてきた（Ｂｃｌ－２ファミリータンパク質、シトクロムｃ）。最後に、ミトコンドリアインポート受容体タンパク質ＴＯＭ２２のタンパク質レベルの調節によって例示されるように（本明細書に記載する実験を参照）、新たなミトコンドリアタンパク質がＱ１０処置によって調節されていることが同定された。

【０３７４】

ミトコンドリア濃縮試料の産生

皮膚癌ＳＫＭＥＬ－２８細胞を１００μＭ　Ｑ１０または偽ビヒクルによって６、１９、または４８時間にわたって処置した。細胞をＴ－１６０フラスコ（各時点ごとに４個）から洗浄およびこすり落としによって収集した。細胞を遠心分離によって採取し、ペレットを急速凍結させて－８０℃にて貯蔵した。細胞ペレットを再懸濁させ、２ｍＬダウンスホモジナイザを使用して破砕した。試薬および方法は、培養細胞用ミトコンドリア単離キット（ＭｉｔｏＳｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号ＭＳ８５２）から取得した。結果として生じたミトコンドリア試料一定分量７５μＬ（１試料に付き、４～５個の一定分量）に分け、－８０℃にて貯蔵した。

【０３７５】

Ｑ１０によって処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞から単離されたミトコンドリア濃縮試料のプロテオミクス分析

２次元ゲル電気泳動は、１００μＭ　Ｑ１０によって６、１９、および４８時間処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８ミトコンドリア濃縮試料に２個の一定分量から溶解されたタンパク質に対して（対応する偽ビヒクル対照と共に）遂行した。試料に２次元電気泳動に供した（２通り）。５２５個のタンパク質スポットの分析を遂行して、対照試料を残りの時点の試料に対して比較した（図１１）。

【０３７６】

９つの統計的に有意な示差的スポット変化を２次元電気泳動ゲルの比較分析から選択した。９個のスポットを切除して、トリプシン消化による同定および質量分析キャラクタリゼーションに供した。

【表４】

表４　ＳＫＭＥＬ－２８ミトコンドリアにおけるＱ１０処置に対して示差的応答を有することが同定されたタンパク質

スポット数	タンパク質	名称	機能	応答（倍率変化）
１１	不明のタンパク質	？	？	６時間にて上昇（１．３）、この後、低レベルまで降下
１３１	不明、スポット数１１と同様、修飾	？	？	６時間にて低下（１．３）、１９および４８時間ではさらに降下
２７９	アシル－ＣｏＡチオエステラーゼ７アイソフォームｈＢＡＣＨｂ	ＡＣＯＴ７	脂肪アシル－ＣｏＡを遊離脂肪酸およびＣｏＡに切断する	６時間にて低下（１．３）、４８時間にて正常に戻る
３７２	ピルビン酸キナーゼ	ＰＫＭ２	ピルビン酸およびＡＴＰからのホスホエノールピルビン酸の産生を触媒する	６時間にて上昇（１．５）、４８時間にて正常に戻る
１１０	ＥＲ６０タンパク質	ＰＤＩＡ３	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ	１９および４８時間にて上昇
１８５	ケラチン１０	ＫＲＴ１０	中間フィラメント	１９時間にてのみ上昇
２０２	ベータアクチン		構造タンパク質	１９時間にてのみ上昇
２４６	マレクチン	ＭＬＥＣ	小胞体の炭水化物結合タンパク質およびタンパク質Ｎ－グリコシル化の早期ステップにおける候補プレイヤー	１９時間にてのみ上昇
７５	５８を含有するコイル化コイルドメイン	ＣＣＤＣ５８	保存された仮説的タンパク質核孔形成	４８時間にて上昇

【０３７７】

アシル－ＣｏＡチオエステラーゼ７：アシル－ＣｏＡチオエステラーゼ７（ＡＣＯＴ７）は、脂肪アシル－ＣｏＡの遊離脂肪酸およびＣｏＡの加水分解を触媒する酵素ファミリーのメンバーである。本酵素はそれゆえ、脂質代謝および細胞シグナル伝達の調節に役割を果たす。ＡＣＯＴ７は、８～１６個の炭素原子（Ｃ８－Ｃ１６）の脂肪酸鎖を有する長鎖アシルＣｏＡ基質に対する選択性を有する。ＡＣＯＴ７における正確な細胞機能は、十分に理解されていない。本遺伝子の転写は、ステロール調節要素結合タンパク質２によって活性化され、それゆえコレステロール代謝における機能を示唆する。

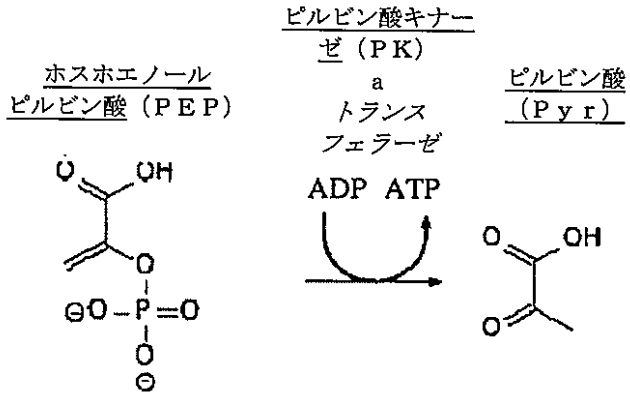
【０３７８】

本実施例の結果は、ＡＣＯＴ７がＱ１０の代謝に直接または間接的に潜在的に関与することを指摘する。それゆえターゲティングＡＣＯＴ７は、Ｑ１０の細胞間レベルの調節を促進して、それゆえ細胞Ｑ１０効果に影響を及ぼすことができる。

【０３７９】

ピルビン酸キナーゼ：ピルビン酸キナーゼは、解糖の最後のステップに関与する酵素である。ピルビン酸キナーゼは、ホスホエノールピルビン酸（ＰＥＰ）からＡＤＰへのリン酸基の移動を触媒して、ピルビン酸１分子およびＡＴＰ１分子を産する。

【化３】



【０３８０】

タンパク質は、これがミトコンドリア濃縮ＳＫ－ＭＥＬ－２８試料から同定されたので、おそらく２型アイソフォームのＰＫＭ２のタンパク質である。本アイソフォームは、腫瘍細胞形成および調節に関与することが周知である。

【０３８１】

ミトコンドリアにおけるＱ１０レベルの定量

コエンザイムＱ１０（Ｑ１０）および還元型ユビキノール－１０（Ｑ１０Ｈ２）の同時決定の方法は、最近公開された方法（Ｒｕｉｚ－Ｊｉｍｅｎｅｚ，２００７，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａ　Ａ，１１７５，２４２－２４８）に基づいて、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを陽イオンモードエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）と共に使用することによって実行した。Ｑ１０およびＱ１０Ｈ２の両方の高選択的同定および高感受性定量は、他の選択された脂質の同定と共に可能である。１００μＭ　Ｑ１０によって処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８からのミトコンドリア濃縮試料の一定分量に、タンパク質沈殿、液液抽出、合せたヘキサン抽出物の蒸発乾固および９５：５　メタノール／ヘキサン（ｖ／ｖ）での再構成に基づく、慣習的な前処置に供した。

【０３８２】

本分析において、Ｑ１０、Ｑ１０Ｈ２、およびＱ９を定量した（表５）。関連する分子Ｑ９のレベルは低く、検出レベル付近であった。未処置試料のレベルは、この同じレベルを有する６時間Ｑ１０処置試料と比較的一致していた。全材料の試料分散を制御するために、コレステロールのレベルも測定して、差が試料サイズ誤差によるものでないことを確認した。Ｑ１０レベルが同じミトコンドリア調製物の他の一定分量のタンパク質抽出によって取得された全タンパク質値に対して補正されたときに、相対比は比較可能であった。それゆえＱ１０レベルの著しい上昇が１９時間後に得られ（約３倍）、４８時間時点までになお大きな上昇（約６倍）が得られた（図１２）。

【表５】

表５　培地中で１００μＭ　Ｑ１０によって処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞からのミトコンドリア濃縮試料中に存在するＱ１０のレベルのＨＰＬＣ－ＭＳ定量結果

			ピーク面積		ｎｇ／試料			μｇ／試料
ファイル	試料	注入	Q9	Q10	Q9	Q10	$Q10H_2$	コレステロール
081204-05	100ng標準	10%	245, 342	352792				
081204-06	6時間モック番号1	5 ul	2560	32649	1. 04	9. 25		
051204-07	溶媒ブランク番号1	5 ul	3781	3174	1. 54	0. 9		
081204-08	溶媒ブランク番号2	20%	2396	4399	0. 98	1. 25		
081204-09	6時間モック番号2	10 ul	1572	36328	0. 64	10. 3		
081204-10	溶媒ブランク番号3	20%	1722	2504	0. 7	0. 71		
081204-11	48時間Q10処置	20%	4879	164496	1. 99	46. 63	0. 28	13. 86
081204-12	48時間モック	20%	2412	25552	0. 98	7. 24	0. 09	13. 04
081204-13	6時間Q10処置	20%	692	25427	0. 28	7. 21		
081204-14	19時間Q10処置	20%	1161	59164	0. 47	16. 77		
081204-15	19時間モック	20%	901	19999	0. 37	5. 67		

【０３８３】

本試験からの驚くべき結果は、Ｑ１０が酸化型として細胞に供給されるという発見であった。４８時間試料では、還元型Ｑ１０Ｈ２も測定され、著しく低い量で存在することが見出された（ＣｏＱ１０　４６．６３ｎｇ／試料と比較して、ＣｏＱ１０Ｈ２　０．２８ｎｇ／試料）。Ｑ１０処置４８時間試料においてＱ１０Ｈ２のレベルの一般的な上昇（３倍）があったが、レベルはアッセイの推定検出限界付近であった。興味深いことに、酸化型（Ｑ１０）は、生物系において酸化エンハンサとして作用することができる。文献によれば、ヒト血漿をＱ１０およびＱ１０Ｈ２を評価したとき、分子の大部分（９０％）は、抗酸化剤として作用することができる、Ｑ１０Ｈ２の還元型で見出された（Ｒｕｉｚ－Ｊｉｍｅｎｅｚ，２００７，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａ　Ａ，１１７５，２４２－２４８）。

【０３８４】

それゆえこれらの結果は、培地へのＱ１０の外部からの添加時にＱ１０のレベルがミトコンドリア中で上昇することを確認および定量する。驚くべきおよび予想外の発見は、Ｑ１０がいずれの著しい量でも供給された酸化型（酸化促進）で維持されて、Ｑ１０Ｈ２の還元（抗酸化）型に変化されないことであった。

【０３８５】

実施例６：リアルタイムＰＣＲアレイ

実験１：アポトーシスアレイ

実施例３で上述したように、癌細胞のＱ１０への曝露は、アポトーシスプロセスによりこれらの細胞の部分に死を誘導する。Ｑ１０応答に関与するタンパク質を同定するために、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）法を用いて、アポトーシスにターゲットされた経路アレイに関与する遺伝子／タンパク質についてのｍＲＮＡのレベルの変化を同定した。

【０３８６】

それゆえＰＣＲアレイをスクリーニングツールとして使用して、細胞内のＱ１０の生物学的作用の様式への洞察を潜在的に供給する一連の分子ターゲットを評価した。８０の経路特異的ターゲットを含有する事前に選択されたサブセットのｍＲＮＡレベルを影響評価するためのリアルタイムＰＣＲ定量を使用して、ｍＲＮＡの変化を評価した。

【０３８７】

ｍＲＮＡ結果の解釈のために、そのｍＲＮＡ転写が２倍のレベルで改変された遺伝子を同定および評価した。ｍＲＮＡのみを産生する遺伝子転写のレベルは、発現されたタンパク質のレベルの潜在的な変化の大まかな推定値を提供する。当業者は、各ｍＲＮＡが非効率的なことに、ｍＲＮＡの分解またはその翻訳で異なる速度を有し得て、それゆえ異なる

量のタンパク質を生じることを認識するであろう。

【０３８８】

５０ｕｍ　Ｑ１０によって２４時間処置したＳｋＢｒ－３細胞

ＲＴ－ＰＣＲのアッセイ方法を利用して、合計８４のアポトーシス経路関連タンパク質に対するｍＲＮＡレベルの変化の尺度を提供した。Ｑ１０（２４時間）を用いた、ＳｋＢｒ３に対するリアルタイムＰＣＲアポトーシス分析による実験は、以下のｍＲＮＡ：Ｂｃｌ２、Ｂｃｌ２Ｌ１、Ｂｃｌ２Ｌ１１、Ｂｉｒｃ６、Ｂａｘ、Ｘｉａｐ、Ｈｐｒｔ１、Ａｐａｆ１、Ａｂｌ１、Ｂｒａｆが影響されていることを同定した。これらの結果は再度、Ｑ１０処置に対する癌細胞のアポトーシス応答を裏付ける証拠を提供した。

【表６Ａ】

表６Ａ

記号	上方ー下方調節	ユニジーン	参照配列	内容	G名称
BCL2L1	13.1957	Hs.516966	NM_138578	BCL2様1	BCL-XL/S
BNIP2	6.3291	Hs.646490	NM_004330	BCL2/アデノウイルスE1B 19kDa共役タンパク質2	BNIP-2/NIP2
BCL2	5.4717	Hs.150749	NM_000633	B細胞 CLL/リンパ腫2	Bcl-2
BIRC6	4.7966	Hs.150107	NM_016252	バキュロウイルスIAPリピート含有6（アポロン）	アポロン/ブルース
BCL2L11	4.6012	Hs.469658	NM_006538	BCL2様11（アポトーシス促進物質）	BAM/BIM
XIAP	4.3832	Hs.356076	NM_001167	アポトーシスのX連結阻害剤	API3/BIRC4
BRAF	4.3832	Hs.550061	NM_004333	V-rafマウス肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログB1	B-raf1/BRAF1
BAX	3.896	Hs.631546	NM_004324	BCL2関連Xタンパク質	Baxゼータ
APAF1	2.6244	Hs.708112	NM_001160	アポトーシスペプチダーゼ活性化因子	CED4/DKFZp781B1145
HPRT1	-160.6748	Hs.412707	NM_000194	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（レッシュナイハン症候群）	HGPRT/HPRT

【０３８９】

ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞による３つの独立した実験からの一致した結果を下の表６Ｂにまとめる。１００μＭ　Ｑ１０処置により多くの遺伝子は、ＳＣＣ細胞において同様に調節される。ＳＣＣ細胞で調節されると思われるアポトーシスアレイの遺伝子を表７に記載する。我々は、多くの遺伝子がＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞およびＳＣＣ細胞の両方で６時間後に調節されていることを見出している。２４時間までに調節は低下する。ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞およびＳＣＣ細胞の両方で調節されると思われる遺伝子を表８に記載する。

【表６Ｂ】

表６Ｂ　アポトーシスアレイによって分析したときの、１００μＭ　Ｑ１０処置によって調節されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞の遺伝子

記号	内容	調節	局在	考えられる機能
ＡＢＬ１	Ｃ－ａｂｌ癌遺伝子１、受容体チロシンキナーゼ	７２時間にて下方調節	核	チロシンキナーゼ
ＢＡＧ１	ＢＣＬ２関連アタノジーン	４８時間にて上方調節	細胞質	抗アポトーシス、グルココルチコイド受容体経路
ＢＣＬ２	Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２	４８時間にて下方調節	細胞質	細胞死
ＢＣＬ２Ａ１	ＢＣＬ２関連タンパク質Ａ１	４８時間にて下方調節	細胞質	カスパーゼを調節して、ＴＰ７３をリン酸化する
ＢＣＬ２Ｌ１	ＢＣＬ２様１	７２時間にて下方調節	細胞質	カスパーゼ阻害剤
ＢＣＬ２Ｌ１０	ＢＣＬ２様１０（アポトーシス促進物質）	４８時間にて下方調節	細胞質	カスパーゼ活性化因子
ＢＣＬ２Ｌ１１	ＢＣＬ２様１１（アポトーシス促進物質）	４８時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス促進性、カスパーゼ３アクチベーター
ＢＩＲＣ３	バキュロウイルスＩＡＰリピート含有３	６時間にて下方調節	細胞質	抗アポトーシス性
ＢＩＲＣ８	バキュロウイルスＩＡＰリピート含有８	４８時間にて下方調節	細胞質	カスパーゼを活性化する
ＣＡＲＤ８	カスパーゼ動員ドメインファミリー、メンバー８	４８時間にて下方調節	核	カスパーゼ活性化因子
ＣＡＳＰ１４	カスパーゼ１４、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	４８時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス関連システインペプチダーゼ
ＣＡＳＰ５	カスパーゼ５、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	４８時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス関連システインペプチダーゼ
ＣＤ４０ＬＧ	ＣＤ４０リガンド（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー５、高ＩｇＭ症候群）	４８時間にて下方調節	細胞外空間	ＣＤ４０受容体結合
ＣＩＤＥＡ	細胞死誘導ＤＦＦＡ様エフェクタａ	４８時間にて上方調節	細胞質	アポトーシス促進性
ＦＡＤＤ	デスドメインを介したＦａｓ（ＴＮＦＲＳＦ６）関連	６時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス促進性
ＦＡＳ	Ｆａｓ（ＴＮＦ受容体スーパーファミリー、メンバー６）	４８時間にて上方調節	原形質膜	アポトーシス促進性
ＦＡＳＬＧ	Ｆａｓリガンド（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー６）	４８時間にて下方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
ＧＡＤＤ４５Ａ	増殖停止およびＤＮＡ損傷誘導性、アルファ	４８時間にて上方調節	核	増殖停止
ＨＲＫ	ハラキリ、ＢＣＬ２共役タンパク質（ＢＨ３ドメインのみを含有する）	４８時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス促進性
ＰＹＣＡＲＤ	ＰＹＤおよびＣＡＲＤドメイン含有	６時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス・プロテアーゼ・アクチベーター

【０３９０】

TNF	腫瘍壊死因子（TNFスーパーファミリー、メンバー2）	４８時間にて上方調節、次に下方調節	細胞外空間	ＴＮＦ受容体結合
TNFRSF10A	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１０ａ	４８時間にて上方調節、次に下方調節	原形質膜	カスパーゼ活性化因子
TNFRSF10B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー１０ｂ	７２時間にて下方調節	原形質膜	ｐ５３シグナル伝達、カスパーゼ活性化
TNFRSF1A	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１Ａ	７２時間にて下方調節	原形質膜	アポトーシス促進性
TNFRSF21	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー２１	４８時間にて下方調節	原形質膜	カスパーゼを活性化する
CD27	ＣＤ２７分子	４８時間にて下方調節	原形質膜	カスパーゼ阻害剤
TNFRSF9	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９	４８時間にて下方調節	原形質膜	アポトーシス促進性
TNFSF10	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー１０	４８時間にて上方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
TP73	腫瘍タンパク質ｐ７３	４８時間にて下方調節	核	転写因子
TRAF3	ＴＮＦ受容体関連因子３	４８時間にて下方調節	細胞質	ジンクフィンガードメイン
TRAF4	ＴＮＦ受容体関連因子４	４８時間にて下方調節	細胞質	ジンクフィンガードメイン

【表７】

表７　アポトーシスアレイによって分析したときの、１００μＭ　Ｑ１０処置によって調節されたＳＣＣ細胞の遺伝子

記号	内容	調節
ＡＫＴ１	Ｖ－ａｋｔマウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ１	６時間にて下方調節、次に２４時間にて上方調節
ＢＡＧ４	ＢＣＬ２関連アタノジーン（ａｔｈａｎｏｇｅｎｅ）４	２４時間にて上方調節
ＢＡＸ	ＢＣＬ２関連Ｘタンパク質	２４時間にて上方調節
ＢＣＬ２	Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２	２４時間にて上方調節
ＢＣＬ２Ｌ１	ＢＣＬ２様１	６時間にて下方調節、次に２４時間にて上方調節
ＢＩＲＣ３	バキュロウイルスＩＡＰリピート含有３	６時間にて下方調節
ＢＮＩＰ３	ＢＣＬ３／アデノウイルスＥ１Ｂ　１９ｋＤａ共役タンパク質２	２４時間にて下方調節
ＣＡＲＤ６	カスパーゼ動員ドメインファミリー、メンバー６	６時間にて下方調節
ＣＡＳＰ６	カスパーゼ６、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	２４時間にて上方調節
ＣＡＳＰ７	カスパーゼ７、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	２４時間にて上方調節
ＣＤ４０	ＣＤ４０分子、ＴＮＦ　受容体スーパーファミリーメンバー５	６時間にて下方調節
ＦＡＤＤ	デスドメインを介したＦａｓ（ＴＮＦＲＳＦ６）関連	２４時間にて上方調節
ＧＡＤＤ４５Ａ	増殖停止およびＤＮＡ損傷誘導性、アルファ	２４時間にて上方調節
ＨＲＫ	ハラキリ、ＢＣＬ２　共役タンパク質（ＢＨ３ドメインのみを含有する）	２４時間にて上方調節
ＴＮＦＲＳＦ２１	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー２１	６時間にて下方調節
ＴＮＦＲＳＦ２５	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー２５	６時間にて下方調節、次に２４時間にて上方調節
ＣＤ２７	ＣＤ２７分子	６時間にて下方調節
ＴＮＦＲＳＦ９	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９	６時間にて下方調節
ＴＮＦＳＦ１０	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー１０	２４時間にて上方調節
ＣＤ７０	ＣＤ７０分子	６時間にて下方調節
ＴＰ５３	腫瘍タンパク質ｐ５３	２４時間にて上方調節
ＴＰ７３	腫瘍タンパク質ｐ７３	６時間にて下方調節、次に２４時間にて上方調節
ＴＲＡＦ２	ＴＮＦ受容体関連因子２	２４時間にて上方調節

【表８】

表８　ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞およびＳＣＣ細胞の両方において１００μＭＱ１０処置によって調節されたアポトーシスアレイからの遺伝子

記号	内容
ＢＣＬ２	Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２
ＢＣＬ２Ｌ１	ＢＣＬ２様１（Ｂｃｌ－ｘｌ）
ＢＩＲＣ３	バキュロウイルスＩＡＰリピート含有３
ＦＡＤＤ	デスドメインを介したＦａｓ（ＴＮＦＲＳＦ６）関連
ＧＡＤＤ４５Ａ	増殖停止およびＤＮＡ損傷誘導性、アルファ
ＴＮＦＲＳＦ２１	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー２１
ＣＤ２７	ＣＤ２７分子
ＴＮＦＲＳＦ９	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９
ＴＮＦＳＦ１０	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー１０
ＴＰ７３	腫瘍タンパク質ｐ７３
ＴＲＡＦ２	ＴＮＦ受容体関連因子２

【０３９１】

興味深いことに、改変されたｍＲＮＡレベルは、一連のアポトーシスタンパク質において著しい上方調節を示し、Ｂｃｌ－ｘｌは最も高いものの１つであった。これはＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞に対するタンパク質アレイ実験でも観察された。

【０３９２】

Ｂｃｌ－ｘｌは、ミトコンドリア中の膜貫通分子である（Ｂｃｌ－ｘｌは「基底細胞リンパ腫－特大」を表す）。Ｂｃｌ－ｘｌは、ＦＡＳ－Ｌのシグナル伝達経路に関与し、タンパク質のＢｃｌ－２ファミリーのメンバーである複数の抗アポトーシスタンパク質の１つである。Ｂｃｌ－ｘｌは、癌細胞の生存に関わってきた。しかし、ヒトＢｃｌ－ｘｍＲＮＡの選択的スプライシングが少なくとも２種類の別個のＢｃｌ－ｘｍＲＮＡ種、Ｂｃｌ－ｘＬおよびＢｃｌ－ｘＳを生じ得ることが公知である。優勢なタンパク質生成物（２３３アミノ酸）は、成長因子除去時に細胞死を阻害する、より大型のＢｃｌ－ｘ　ｍＲＮＡであるＢｃｌ－ｘＬである（Ｂｏｉｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３．Ｃｅｌｌ　７４，５９７－６０８）。他方では、Ｂｃｌ－ｘＳは、Ｂｃｌ－２が細胞死を阻害する能力を阻害して、細胞をアポトーシス細胞死に対して感受性にする。利用した使用アッセイは、どのＢｃｌ－ｘのアイソフォームが上方調節されているかを識別しない。これらの研究でＣｏＱによって上方調節されているＢｃｌ－ｘアイソフォームは、当分野で公知の所定の方法によって、例えばＲＴ－ＰＣＲ方法を使用することによって決定され、２種類のｍＲＮＡスプライシングアイソフォームの比（Ｂｃｌ－ｘＬ対Ｂｃｌ－ｓＬ）が評価され得る。

【０３９３】

アポトーシス関連タンパク質の調査から、複数のアポトーシス促進因子および抗アポトーシス因子がＢＣＬ－２ファミリー中にあること、またはこれらの因子と相互作用するタンパク質が発現レベルを調節したこと（ＢＣＬ２Ｌ１１、ＢＮＩＰ２、ＢＡＧ１、ＨＲＫ、ＢＡＫ１、ＢＣＬ２、ＢＣＬ２Ｌ１）が観察された。これらのタンパク質は、ミトコンドリア外膜透過を支配する。

【０３９４】

アポトーシス応答の早期マーカーは、カスパーゼ３／７タンパク質によるアポトーシスの以前の観察結果と一致する、カスパーゼ－９の上方調節（１６時間）によって観察される。ストレスシグナル伝達経路の誘導は、ミトコンドリアからのシトクロムｃの放出およびａｐａｆ－１（アポトソーム）の活性化を引き起こし、次にカスパーゼ－９のプロ酵素を切断して活性型とする。いったん開始されると、カスパーゼ－９はプロカスパーゼ－３およびプロカスパーゼ－７の切断を進めて、追加のアポトーシス経路を始動させる。

【０３９５】

調節されているタンパク質の腫瘍壊死因子受容体ファミリーへの一貫した連結もある。

【０３９６】

腫瘍タンパク質ｐ７３の強力な下方調節も注目される。乳癌および卵巣癌を含む、ヒトに見出される多くの腫瘍の分析は通例、対応する範囲において正常な組織と比較したときに、ｐ７３の高い発現を示す。最近の発見は、哺乳動物細胞において細胞周期制御およびＤＮＡの合成に関与する体内の転写因子（すなわち：Ｅ２Ｆ－１）の調節解除された過剰発現がｐ７３の発現を誘導することを示唆している。該示唆は、ｐ７３は腫瘍性タンパク質であり得るが、関連するｐ５３タンパク質とは異なる機構を包含し得ることである。アポトーシス経路のマッピングを示す概略図を図１３に示す。

【０３９７】

ＳＫＭＥＬ－２８細胞

アポトーシス関連タンパク質の調査から、複数のアポトーシス促進因子および抗アポトーシス因子がＢＣＬ－２ファミリー中にあること、またはこれらの因子と相互作用するタンパク質が発現レベルを調節したこと（ＢＣＬ２Ｌ１１、ＢＮＩＰ２、ＢＡＧ１、ＨＲＫ、ＢＡＫ１、ＢＣＬ２、ＢＣＬ２Ｌ１）が観察された。これらのタンパク質は、ミトコンドリア外膜透過を支配する。

【０３９８】

アポトーシス応答の早期マーカーは、カスパーゼ３／７タンパク質によるアポトーシスの以前の観察結果と一致する、カスパーゼ－９の上方調節（１６時間）によって観察される。ストレスシグナル伝達経路の誘導は、ミトコンドリアからのシトクロムｃの放出およびａｐａｆ－１（アポトソーム）の活性化を引き起こし、次にカスパーゼ－９のプロ酵素を切断して活性型とする。いったん開始されると、カスパーゼ－９はプロカスパーゼ－３およびプロカスパーゼ－７の切断を進めて、追加のアポトーシス経路を始動させる。

【表９】

表９　アポトーシス経路の周辺に焦点をあてたＲＴ－ＰＣＲアレイにより評価した、１００μＭのＡ１０で処理したＳＫＭＥＬ－２８細胞についてのｍＲＮＡレベルの変化

参照配列	内容	記号	6時間 Q10	１６時間 Q10	２４時間 Q10	７２時間 Q10
NM_006538	ＢＣＬ２様１１（アポトーシス促進物質）	BCL2L11	2.13	2.41	1.92	2.51
NM_000875	インスリン様成長因子１受容体	IGF1R	1.77	1.09	1.33	1.25
NM_004048	ベーター２－ミクログロブリン	B2M	1.74	1.76	1.58	3.11
NM_003921	Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫１０	BCL10	1.55	1.87	1.48	−3.11
NM_004330	ＢＣＬ２／アデノウイルスＥ１Ｂ　１９ｋＤａ共役タンパク質２	BNIP2	1.46	1.51	1.57	−1.61
NM_005157	Ｃ－ａｂｌ癌遺伝子１、受容体チロシンキナーゼ	ABL1	1.42	2.77	−1.22	−2.03
NM_004323	ＢＣＬ２関連アタノジーン	BAG1	1.41	1.44	−1.61	−2.45
NM_001229	カスパーゼ９、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	CASP9	1.32	3.96	1.83	1.14
NM_003806	ハラキリ、ＢＣＬ２　共役タンパク質（ＢＨ３ドメインのみを含有する）	HRK	1.18	4.52	2.73	−1.14
NM_001924	増殖停止およびＤＮＡ損傷誘導性、アルファ	GADD45A	1.07	3.34	1.13	−2.36
NM_001188	ＢＣＬ２－アンタゴニスト／キラー１	BAK1	1.06	2.73	−1.00	−4.54
NM_004295	ＴＮＦ受容体関連因子４	TRAF4	−1.91	2.63	−1.58	−740.66
NM_003842	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー１０ｂ	TNFRSF10B	−2.07	1.53	−1.81	−710.49
NM_000633	Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２	BCL2	−2.98	−1.63	−2.82	−11.36
NM_001242	ＣＤ２７分子	CD27	−3.40	−2.38	−1.35	−12.72
NM_014430	細胞死誘導ＤＦＦＡ様イフェクタｂ	CIDEB	−3.48	1.56	−3.69	−2.59
NM_001065	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１Ａ	TNFRSF1A	−4.53	2.28	−3.30	1.22
NM_005427	腫瘍タンパク質ｐ７３	TP73	−4.66	−9.80	−8.71	−26.96
NM_003844	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１０ａ	TNFRSF10A	−4.84	−5.26	−4.33	−11.84
NM_138578	ＢＣＬ２様１	BCL2L1	−4.94	−1.80	−6.17	−7.04
NM_001165	バキュロウイルスＩＡＰリピート含有３	BIRC3	−13.68	−1.98	−2.42	−3.42

【０３９９】

調節されているタンパク質の腫瘍壊死因子受容体ファミリーへの一貫した連結がある。

【０４００】

腫瘍タンパク質ｐ７３の強力な下方調節も注目される。乳癌および卵巣癌を含む、ヒトに見出される多くの腫瘍の分析は通例、対応する範囲において正常な組織と比較したときに、ｐ７３の高い発現を示す。最近の発見は、哺乳動物細胞において細胞周期制御およびＤＮＡの合成に関与する体内の転写因子（すなわち：Ｅ２Ｆ－１）の調節解除された過剰発現がｐ７３の発現を誘導することを示唆している。該示唆は、ｐ７３は腫瘍性タンパク質であり得るが、関連するｐ５３タンパク質とは異なる機構を包含し得ることである。

【０４０１】

実験２：酸化ストレスおよび抗酸化防御アレイを使用するリアルタイムＰＣＲアレイ

Ｑ１０応答に関与するタンパク質を同定するために、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）法を用いて、酸化ストレスおよび抗酸化防御にターゲットされた経路

アレイに関与する遺伝子／タンパク質についてのｍＲＮＡのレベルの変化を同定した。

【０４０２】

下の表１０は、１００μＭ　Ｑ１０処置によりＳＫ－ＭＥＬ２８細胞で調節される遺伝子を挙げる。結果は、２つの独立した実験で調節されるこのような遺伝子のみについて与える。６時間では著しい量の遺伝子調節が見られるが、４８時間ではＲＮＡレベルの最も著しい変化が見られる。

【表１０】

表１０　酸化ストレスおよび抗酸化防御アレイで見られるような１００μＭＱ１０処置によって調節されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞の遺伝子

記号	内容	調節	局在	考えられる機能
ＡＬＢ	アルブミン	４８時間にて下方調節	細胞外空間	担体タンパク質、抗アポトーシス性
ＡＯＸ１	アルデヒドオキシダーゼ１	１６時間から上方調節	細胞質	フリーラジカルを産生する、薬物代謝プロセス。
ＡＰＯＥ	アポリポタンパク質Ｅ	４８時間にて下方調節	細胞外空間	脂質代謝
ＡＴＯＸ１	ＡＴＸ１抗酸化タンパク質１ホモログ（酵母）	４８時間にて下方調節	細胞質	銅代謝
ＢＮＩＰ３	ＢＣＬ３／アデノウイルスＥ１Ｂ　１９ｋＤａ共役タンパク質２	４８時間にて下方調節	細胞質	抗アポトーシス性
ＣＳＤＥ１	低温ショックドメイン含有Ｅ１、ＲＮＡ結合	４８時間にて下方調節	細胞質	転写調節
ＣＹＢＡ	シトクロムｂ－２４５、アルファポリペプチド	４８時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス性、
ＣＹＧＢ	シトグロビン	４８時間にて下方調節	細胞質	ペルオキシダーゼ、トランスポータ
ＤＨＣＲ２４	２４－デヒドロコレステロールレダクターゼ	６時間にて下方調節	細胞質	電子担体は、アポトーシスに関与するＴＰ５３に結合する
ＤＵＯＸ１	デュアルオキシダーゼ１	４８時間にて上方調節	原形質膜	カルシウムイオン結合、電子担体
ＤＵＯＸ２	デュアルオキシダーゼ２	４８時間にて下方調節	不明	カルシウムイオン結合
ＥＰＨＸ２	エポキシドヒドロラーゼ２、細胞質	４８時間にて下方調節	細胞質	アラキドン酸代謝
ＥＰＸ	好酸球ペルオキシダーゼ	４８時間にて下方調節	細胞質	フェニルアラニン代謝、アポトーシス
ＧＰＸ２	グルタチオンペルオキシダーゼ２（胃腸）	４８時間にて下方調節	細胞質	電子担体は、アポトーシスに関与するＴＰ５３に結合する
ＧＰＸ３	グルタチオンペルオキシダーゼ３（血漿）	４８時間にて上方調節	細胞外空間	アラキドン酸代謝、癌腫において上方調節
ＧＰＸ５	グルタチオンペルオキシダーゼ５（エピジジマルアンドロゲン関連タンパク質）	４８時間にて上方調節	細胞外空間	アラキドン酸代謝
ＧＰＸ６	グルタチオンペルオキシダーゼ６（嗅覚）	４８時間にて下方調節	細胞外空間	アラキドン酸代謝
ＧＳＲ	グルタチオンレダクターゼ	４８時間にて下方調節	細胞質	グルタメートおよびグルタチオン代謝、アポトーシス
ＧＴＦ２Ｉ	基本転写因子ＩＩ、ｉ	６時間にて下方調節	核	転写アクチベーター、ｆｏｓの転写
ＫＲＴ１	ケラチン１（表皮溶解性角化症）	４８時間にて上方調節	細胞質	糖結合
ＬＰＯ	ラクトペルオキシダーゼ	４８時間にて下方調節	細胞外空間	フェニルアラニン代謝
ＭＢＬ２	マンノース結合レクチン（タンパク質Ｃ）２、可溶性（オプソニン欠損）	４８時間にて下方調節	細胞外空間	補体シグナル伝達、受容体におけるパターン認識
ＭＧＳＴ３	ミクロソームグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ３	１６時間にて上方調節	細胞質	異物代謝
ＭＰＯ	ミエロペルオキシダーゼ	４８時間にて下方調節	細胞質	抗アポトーシス性、フェニルアラニン代謝

【０４０３】

MPV17	ＭｐＶ１７ミトコンドリア内膜タンパク質	６時間にて下方調節	細胞質	ミトコンドリアＤＮＡの維持
MT3	メタロチオネイン３	４８時間にて下方調節	細胞質	銅イオン結合
NCF1	好中球サイトゾル因子１、（慢性肉芽腫性疾患、常染色体１）	６時間から下方調節	細胞質（Ｃｙｏｐｌａｓｍ）	遊離ラジカルを産生する
NCF2	好中球サイトゾル因子２（６５ｋＤａ、慢性肉芽腫性疾患、常染色体２）	４８時間にて上方調節	細胞質	電子担体
NME5	非転移性細胞５、（ヌクレオシドー２リン酸キナーゼ）にて発現されたタンパク質	４８時間にて下方調節	不明	キナーゼ、プリンおよびピリミジン代謝
NOS2A	１酸化窒素シンターゼ２Ａ（誘導性、肝細胞）	４８時間にて下方調節	細胞質	グルココルチコイド受容体シグナル伝達、アポトーシス
OXR1	酸化抵抗１	４８時間にて下方調節	細胞質	酸化ストレスに応答する
PDLIM1	ＰＤＺおよびＬＩＭドメイン１（エルフィン）	４８時間にて上方調節	細胞質	転写アクチベーター
PIP3-E	ホスホイノシチド結合タンパク質ＰＩＰ３－Ｅ	４８時間にて下方調節	細胞質	ペルオキシダーゼ
PRDX2	ペルオキシレドキシン２	６時間にて下方調節	細胞質	フェニルアラニン代謝における役割細胞死における役割
PRDX4	ペルオキシレドキシン４	２４時間から下方調節	細胞質	チオレドキシンペルオキシダーゼ
PREX1	ホスファチジルイノシトール３，４，５－３リン酸依存性ＲＡＣ交換因子１	４８時間にて下方調節	細胞質	酸素遊離ラジカルを形成する
PRG3	プロテオグリカン３	４８時間にて下方調節	細胞外空間	細胞死における役割
PTGS1	プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ１（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ）	４８時間にて下方調節	細胞質	アラキドン酸代謝、プロスタグランジン合成
PTGS2	プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ２（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ）	４８時間にて上方調節	細胞質	アラキドン酸代謝、プロスタグランジン合成
PXDN	ペルオキシダシンホモログ（ショウジョウバエ）	４８時間にて上方調節	不明	ＴＲＡＦ４に結合、カルシウムイオン結合、鉄イオン結合
PXDNL	ペルオキシダシンホモログ（ショウジョウバエ）様	４８時間にて下方調節	不明	ペルオキシダーゼ、カルシウムイオン結合、鉄イオン結合
RNF7	リングフィンガータンパク質７	１６時間にて上方調節	核	アポトーシス性、銅イオン結合、ユビキチン経路
SGK2	血清／グルココルチコイド調節キナーゼ２	４８時間にて下方調節	細胞質	キナーゼ、カリウムチャネル調節因子
SIRT2	サーチュイン（サイレント接合型情報調節２ホモログ）２（出芽酵母）	１６時間にて上方調節	核	転写因子

【０４０４】

ＳＯＤ１	スーパーオキシドディスムターゼ１、可溶性（筋萎縮性側索硬化症１（成人))	１６時間にて上方調節	細胞質	アポトーシス性、カスパーゼアクチベーター.
ＳＯＤ２	スーパーオキシドディスムターゼ２、ミトコンドリア	１６時間にて上方調節	細胞質	アポトーシス性、ＴＮＦにより調節
ＳＯＤ３	スーパーオキシドディスムターゼ３、細胞外	４８時間にて下方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
ＳＲＸＮ１	スルフィレドキシン１ホモログ（出芽酵母)	４８時間にて下方調節	細胞質	ＤＮＡ結合、オキシドレダクターゼ
ＴＰＯ	甲状腺ペルオキシダーゼ	４８時間にて下方調節	原形質膜	サイログロブリンのヨウ素化、チロシン代謝、フェニルアラニン代謝
ＴＴＮ	タイチン	４８時間にて下方調節	細胞質	アクチン細胞骨格シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達
ＴＸＮＤＣ２	チオレドキシンドメイン含有２（精子)	４８時間にて下方調節	細胞質	ピリミジン代謝

【０４０５】

好中球サイトゾル因子２（ＮＣＦ２、６５ｋＤａ、慢性肉芽腫性疾患、常染色体２）は、初期トップ誘導ｍＲＮＡの１つであった（６時間にて観察された）。続いて１６時間の時点以降、好中球サイトゾル因子１（ＮＣＦ１）（慢性肉芽腫性疾患、常染色体１）は、初期誘導相後に非常に高レベルで誘導された。

【０４０６】

好中球サイトゾル因子２は、好中球に普通見出されるＮＡＤＰＨオキシダーゼとして公知の多タンパク質複合体のサイトゾルサブユニットである。本オキシダーゼは、好中球食胞の内腔に送達されるスーパーオキシドのバーストを産生する。

【０４０７】

ＮＡＤＰＨオキシダーゼ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸オキシダーゼ）は、膜結合酵素複合体である。ＮＡＤＰＨオキシダーゼは、原形質膜ならびに食胞の膜に見出すことができる。これは６つのサブユニットで構成されている。これらのサブユニットは：

１つのＲｈｏグアノシントリホスファターゼ（ＧＴＰアーゼ）、通常Ｒａｃ１またはＲａｃ２（Ｒａｃは、Ｒｈｏ関連Ｃ３ボツリヌス毒素基質を表す）

５つの「ｐｈｏｘ」ユニット（Ｐｈｏｘは、食細胞オキシダーゼを表す。）

・Ｐ９１－ＰＨＯＸ（ヘムを含有する）
・ｐ２２ｐｈｏｘ
・ｐ４０ｐｈｏｘ
・ｐ４７ｐｈｏｘ（ＮＣＦ１）
・ｐ６７ｐｈｏｘ（ＮＣＦ２）

別のＮＡＤＰＨオキシダーゼレベルが変化しないことに注目される。酵素は、スーパーオキシドを発生して、Ｃａ（２＋）依存性方式でＨ＋チャネルとして機能する新規ＮＡＤＰＨオキシダーゼである、ＮＯＸ５である。

【０４０８】

加えて、ホスファチジルイノシトール３，４，５－３リン酸依存性ＲＡＣ交換因子１（ＰＲＥＸ１）も上方調節された。本タンパク質は、小型ＧＴＰ結合タンパク質（ＲＡＣ）のＲＨＯファミリーのグアニンヌクレオチド交換因子として作用する。結合されているＧＤＰを遊離ＧＴＰと交換することによって、ＲＡＣ１を結合および活性化することが示されてきた。主に細胞質で見出されるコードされたタンパク質は、ホスファチジルイノシトール－３，４，５－３リン酸およびヘテロトリマーＧタンパク質のベータガンマサブユニットによって活性化される。

【０４０９】
第２の主な早期誘導タンパク質は、一酸化窒素シンターゼ２Ａ（誘導性、肝細胞）（ＮＯＳ２Ａ）であった。一酸化窒素は、神経伝達ならびに抗菌および抗腫瘍活性を含む複数のプロセスにおいて、生物学的媒介物として作用する反応性遊離ラジカルである。本遺伝子は、肝臓で発現され、リポ多糖類およびあるサイトカインの併用によって誘導可能である一酸化窒素シンターゼをコードする。
【０４１０】
スーパーオキシドディスムターゼ２、ミトコンドリア（ＳＯＤ２）は、鉄／マンガンスーパーオキシドディスムターゼファミリーのメンバーである。これはホモテトラマーを形成し、サブユニットに付きマンガンイオン１個を結合するミトコンドリアタンパク質をコードする。本タンパク質は、酸化的リン酸化のスーパーオキシド副生成物に結合して、これらを過酸化水素および２原子酸素に変換する。本遺伝子の突然変異は、関連する特発性心筋症（ＩＤＣ）、早期老化、散発性運動ニューロン疾患、および癌に関連してきた。
【０４１１】
下方調節されたタンパク質の例は、内因性ＦＯＸＭ１発現がＳ期およびＧ２／Ｍ期にピークに達する細胞周期進行で主要な役割を果たすことが公知である、フォークヘッドボックスＭ１（ＦＯＸＭ１）である。最近の研究は、Ｇ２／Ｍ特異的遺伝子、例えばＰｌｋ１、サイクリンＢ２、Ｎｅｋ２およびＣＥＮＰＦの大型アレイの発現を調節して、染色体分離およびゲノム安定性の維持において重要な役割を果たすことを示している。ＦＯＸＭ１遺伝子は今や、ヒト癌原遺伝子として公知である。ＦＯＸＭ１の異常な上方調節は、基底細胞癌腫（ＢＣＣ）の腫瘍形成に関与している。ＦＯＸＭ１上方調節は続いて、肝臓、乳房、肺、前立腺、子宮頸部、結腸、膵臓、および脳を含む、固形ヒト癌の大部分で見出された。ＢＣＣおよびＱ１０によるさらなる研究によってＦＯＸＭ１レベルを評価すべきである。
【０４１２】
ＳＫＭＥＬ－２８細胞
ＳＫＭＥＬ－２８細胞を使用して、さらなる実験を行った。リアルタイムＰＣＲ法（ＲＴ－ＰＣＲ）を使用して、１００μＭ　Ｑ１０によって処置されたＳＫＭＥＬ－２８細胞中に存在するｍＲＮＡのレベルを未処置細胞のレベルと各種の時点にて比較した。ＰＣＲアレイ（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、経路または疾患に焦点を合せた遺伝子ならびに適切なＲＮＡ品質管理のための、９６ウェルプレートでの最適化リアルタイムＰＣＲプライマアッセイのセットである。ＰＣＲアレイは、マイクロアレイのリアルタイムＰＣＲ感受性および多遺伝子プロファイリング能力を用いて遺伝子発現分析を遂行する。

【表１１】

表１１　酸化ストレスおよび抗酸化防御ＰＣＲアレイで評価されたｍＲＮＡレベルのリストおよび分類　ＳＫＭＥＬ－２８細胞に対する１００μＭ　Ｑ１０による処置の６時間後、ｍＲＮＡレベルの最大の変化は、タンパク質コードを強調することによって示されている（上昇－太字；低下－下線；または変化なし－灰色）。

抗酸化剤：

グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）：GPX1, *GPX2*, GPX3, GPX4, *GPX5*, *GPX6*, *GPX7*, GSTZ1.

ペルオキシレドキシン（TPx）：PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6.

他のペルオキシダーゼ：CAT, *CSDE1*, CYGB, *DUOX1*, *DUOX2*, EPX, GPR156, *LPO* *MPO*, *PIP3-E*, *PTGS1*, PTGS2, PXDN, PXDNL, TPO, TTN.

他の抗酸化剤：*ALB*, APOE, GSR, MT#, SELS, *SOD1*, SOD3, SRXN1, TXNDC2, TXNRD1, *TXNRD2*.

反応性酸素種（ROS）代謝に関与する遺伝子：

スーパーオキシドジムスターゼ（SOD）：SOD1, *SOD2*, *SOD3*.

スーパーオキシド代謝に関与する他の遺伝子：ALOX12, CCS, CYBA, DUOX1, DUOX2, *GTF2I*, MT3, NCF1, NCF2, NOS2A, *NOX5*, *PREX1*, PRG3.

ROS代謝に関与する他の遺伝子：AOX1, BNIP3, *EPHX2*, MPV17, SFTPD.

酸化ストレス応答性遺伝子：ANGPTL7, APOE, ATOX1, CAT, CCL5, *CSDE1*, CYGB, DGKK, DHCR24, DUOX1, DUOX2, DUSP1, EPX, FOXM1, GLRX2, GPR156, GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, *GPX5*, *GPX6*, *GPX7*, GSS, KRT1, *LPO*, MBL2, *MPO*, MSRA, *MTL5*, NME5, NUDT1, OXR1, OXSR1, PDLIM1, *PIP3-E*, PNKP, PRDX2, PRDX5, PRDX6, PRNP, RNF7, *SCARA3*, SELS, *SEPP1*, SGK2, SIRT2, SOD1, *SOD2*, SRXN1, STK25, *TPO*, TTN, *TXNRD2*.

【表１２】

表１２　ＳＫＭＥＬ－２８の１００μＭ処置の時間経過評価　ｍＲＮＡレベルの変化をＲＴ－ＰＣＲ法によって監視して、酸化ストレスおよび抗酸化防御タンパク質アレイを評価した。

参照配列	記号	内容	6時間 Q10	16時間 Q10	24時間 Q10	48時間 Q10	72時間 Q10
NM_000265	NCF1	好中球サイトゾル因子1、(慢性肉芽腫性疾患、常染色体1)	0	高	3.3829	15.7838	31.5369
NM_012423	RPL13A	リボソームタンパク質L13a	-0.9025	3.1857	2.5492	4.9253	7.82
NM_020820	PREX1	ホスファチジルイノシトール3，4，5－3リン酸依存性RAC交換因子1	-3.2971	2.867	0.3222	6.3719	7.476
NM_012237	SIRT2	サーチュイン（サイレント接合型情報調節2ホモログ）2(出芽酵母)	-0.9025	4.0829	4.4766	5.7166	6.6257
NM_005125	CCS	スーパーオキシドジムスターゼの銅シャペロン	-0.6206	3.0077	3.452	2.9801	6.1539
NM_181652	PRDX5	ペルオキシレドキシン5	-2.995	3.0454	3.5381	4.7955	6.0169
NM_016276	SGK2	血清/グルココルチコイド調節キナーゼ2	0	0	0	0.5995	5.937
NM_003551	NME5	非転移性細胞5、(ヌクレオシドジリン酸キナーゼ）にて発現されたタンパク質	-0.6652	3.1138	3.3694	3.1549	5.782
NM_004417	DUSP1	2重特異性ホスファターゼ1	-0.6998	0.5902	2.7713	3.321	5.5375
NM_001752	CAT	カタラーゼ	-0.8589	2.8424	0.1046	3.8557	5.3988
NM_000041	APOE	アポリポタンパク質E	-0.8212	3.2069	-0.9543	3.7694	5.3315
NM_000101	CYBA	シトクロムb－245、アルファポリペプチド	-0.3945	4.3475	3.9208	6.2452	5.0762
NM_000433	NCF2	好中球サイトゾル因子2（65kDa、慢性肉芽腫性疾患、常染色体2）	1.2266	3.0077	0.0954	5.476	0
NM_000963	PTGS2	プロスタグランジンーエンドペルオキシドシンターゼ2（プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ）	-0.6912	2.7046	2.6552	4.0553	-3.3022
NM_183079	PRNP	プリオンタンパク質（p27－30)(クロイツフェルトーヤコブ疾患、ゲルストマンーシュトロイスラーシャインカー症候群、致死性家族性不眠症)	-0.2144	3.5236	2.9086	5.0837	-3.9396
NM_004052	BNIP3	BCL2/アデノウイルスE1B 19kDa共役タンパク質3	-2.9376	3.3288	4.312	-18.2069	-4.8424
NM_000242	MBL2	マンノース結合レクチン(タンパク質C)2、可溶性（オプソニン欠損)	-0.3622	-1.9072	-3.0142	-1.1854	-6.4544
NM_021953	FOXM1	フォークヘッドボックスM1	-0.8135	0.068	-0.9216	3.3655	-10.0953

【０４１３】

好中球サイトゾル因子２（ＮＣＦ２、６５ｋＤａ、慢性肉芽腫性疾患、常染色体２）は、初期トップ誘導ｍＲＮＡの１つであった（６時間にて観察された）。続いて１６時間の時点以降、好中球サイトゾル因子１（ＮＣＦ１）（慢性肉芽腫性疾患、常染色体１）は、初期誘導相後に非常に高レベルで誘導された。

【０４１４】

好中球サイトゾル因子２は、好中球に普通見出されるＮＡＤＰＨオキシダーゼとして公知の多タンパク質複合体のサイトゾルサブユニットである。本オキシダーゼは、好中球食胞の内腔に送達されるスーパーオキシドのバーストを産生する。ＮＡＤＰＨオキシダーゼ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸オキシダーゼ）は、膜結合酵素複合体である。ＮＡＤＰＨオキシダーゼは、原形質膜ならびに食胞の膜に見出すことができる。これは６つのサブユニットで構成されている。これらのサブユニットは：

・１つのＲｈｏグアノシントリホスファターゼ（ＧＴＰアーゼ）、通常Ｒａｃ１またはＲａｃ２（Ｒａｃは、Ｒｈｏ関連Ｃ３ボツリヌス毒素基質を表す）

・５つの「ｐｈｏｘ」（食細胞オキシダーゼ）ユニット

Ｐ９１－ＰＨＯＸ（ヘムを含有する）

ｐ２２ｐｈｏｘ

ｐ４０ｐｈｏｘ

ｐ４７ｐｈｏｘ（ＮＣＦ１）

ｐ６７ｐｈｏｘ（ＮＣＦ２）

別のＮＡＤＰＨオキシダーゼレベルが変化しないことに注目される。酵素は、スーパーオキシドを発生して、Ｃａ（２＋）依存性方式でＨ＋チャネルとして機能する新規ＮＡＤＰＨオキシダーゼである、ＮＯＸ５である。

【０４１５】

加えて、ホスファチジルイノシトール３，４，５－３リン酸依存性ＲＡＣ交換因子１（ＰＲＥＸ１）も上方調節された。本タンパク質は、小型ＧＴＰ結合タンパク質（ＲＡＣ）のＲＨＯファミリーのグアニンヌクレオチド交換因子として作用する。結合されているＧＤＰを遊離ＧＴＰと交換することによって、ＲＡＣ１を結合および活性化することが示されてきた。主に細胞質で見出されるコードされたタンパク質は、ホスファチジルイノシトール－３，４，５－３リン酸およびヘテロトリマーＧタンパク質のベータガンマサブユニットによって活性化される。

【０４１６】

第２の主な早期誘導タンパク質は、一酸化窒素シンターゼ２Ａ（誘導性、肝細胞）（ＮＯＳ２Ａ）であった。一酸化窒素は、神経伝達ならびに抗菌および抗腫瘍活性を含む複数のプロセスにおいて、生物学的媒介物として作用する反応性遊離ラジカルである。本遺伝子は、肝臓で発現され、リポ多糖類およびあるサイトカインの併用によって誘導可能である一酸化窒素シンターゼをコードする。

【０４１７】

下方調節されたタンパク質の例は、内因性ＦＯＸＭ１発現がＳ期およびＧ２／Ｍ期にピークに達する細胞周期進行で主要な役割を果たすことが公知である、ＦＯＸＭ１である。最近の研究は、Ｇ２／Ｍ特異的遺伝子、例えばＰｌｋ１、サイクリンＢ２、Ｎｅｋ２およびＣＥＮＰＦの大型アレイの発現を調節して、染色体分離およびゲノム安定性の維持において重要な役割を果たすことを示している。ＦＯＸＭ１遺伝子は今や、ヒト癌原遺伝子として公知である。ＦＯＸＭ１の異常な上方調節は、基底細胞癌腫（ＢＣＣ）の腫瘍形成に関与している。ＦＯＸＭ１上方調節は続いて、肝臓、乳房、肺、前立腺、頸部、子宮、結腸、膵臓、および脳を含む、固形ヒト癌の大部分で見出された。

【０４１８】

実験３：熱ショックアレイを使用するリアルタイムＰＣＲアレイ

ＳＣＣ細胞に熱ショックアレイを実行して、調節された遺伝子のデータを下の表１３にまとめる。

【表１３】

表１３　ＳＣＣ細胞において１００μＭ　Ｑ１０処置によって調節された熱ショックタンパク質アレイからの遺伝子

記号	内容	調節	位置	考えられる機能
ＣＣＴ６Ｂ	シャペロニン含有ＴＣＰ１、サブユニット６Ｂ（ゼータ２）	２４時間にて下方調節	細胞質	タンパク質フォールディングおよびタンパク質複合体構築
ＤＮＡＪＡ１	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）　ホモログ、サブファミリーＡ、メンバー１	６時間にて上方調節	核	タンパク質フォールディングにおけるＤＮＡ損傷および変化に応答する
ＤＮＡＪＢ１３	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）関連、サブファミリーＢ、メンバー１３	６時間にて下方調節	不明	タンパク質フォールディングおよびアポトーシス
ＤＮＡＪＢ５	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）ホモログ、サブファミリーＢ、メンバー５	６時間にて下方調節	不明	ＨＳＰに結合して、タンパク質フォールディングおよびタンパク質複合体構築に関与する
ＤＮＡＪＣ１２	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）ホモログ、サブファミリーＣ、メンバー１２	６時間にて下方調節	不明	ＨＳＰに結合して、タンパク質フォールディングおよびタンパク質複合体構築に関与する
ＤＮＡＪＣ４	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）ホモログ、サブファミリーＣ、メンバー４	６時間にて下方調節	細胞質	ＨＳＰに結合して、タンパク質フォールディングおよびタンパク質複合体構築に関与する
ＤＮＡＪＣ５Ｂ	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）ホモログ、サブファミリーＣ、メンバー５ベータ	６時間にて下方調節	不明	タンパク質フォールディングに関与して、タンパク質フォールディングの変化に応答する
ＨＳＰＡ８	熱ショック７０ｋＤａタンパク質８	６時間にて上方調節	細胞質	ＴＮＦを調節し、ＢＡＧ１、ＳＴＵＢ１、ＴＰ５３を結合して、アポトーシスに関与する
ＨＳＰＨ１	熱ショック１０５ｋＤａ／１１０ｋＤａタンパク質１	６時間にて上方調節	細胞質	ＨＳＰＡ８に結合、タンパク質フォールディングにとって重要、タンパク質アンフォールディングおよびストレスに応答する

【０４１９】

実験４：糖尿病アレイを使用するリアルタイムＰＣＲアレイ

本実施例に記載した実験を遂行して、Ｑ１０が、複数の遺伝子に影響を有し、細胞の代謝状態を変更するであろうという仮説全体を試験した。１００μＭ　Ｑ１０によって処置したＳＫＭＥＬ－２８細胞からのｍＲＮＡを糖尿病および関連経路に関与するターゲットタンパク質のパネルに対して評価した。本実験からの結果は、解糖経路およびインスリンプロセシングに関与する複数のタンパク質のｍＲＮＡ発現レベルが改変されることを証明している（表１４にまとめる）。

【表１４】

表１４　１００μＭ　Ｑ１０によって１６時間処置されたＳＫＭＥＬ－２８細胞に対する主なｍＲＮＡレベルの変化

参照配列	内容	記号	１６時間後の倍率変化（１００μＭ　Ｑ１０）
ＮＭ＿０００１６２	グルコキナーゼ（ヘキソキナーゼ４）	ＧＣＫ	８．５３８６
ＮＭ＿１７８８４９	肝細胞核因子４、アルファ	ＨＮＦ４Ａ	８．４２１
ＮＭ＿００５２４９	フォークヘッドボックスＧ１	ＦＯＸＧ１	４．６３９６
ＮＭ＿０００５９９	インスリン様成長因子結合タンパク質５	ＩＧＦＢＰ５	２．２７２１
ＮＭ＿００１１０１	アクチン、ベータ	ＡＣＴＢ	－２．０９３６
ＮＭ＿００２８６３	ホスホリラーゼ、グリコーゲン；肝臓（エール病、グリコーゲン蓄積病ＶＩ型）	ＰＹＧＬ	－２．６５
ＮＭ＿００１０６５	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１Ａ	ＴＮＦＲＳＦ１Ａ	－２．８０１１
ＮＭ＿０２１１５８	トリブルズ（Ｔｒｉｂｂｌｅｓ）ホモログ３（ショウジョウバエ）	ＴＲＩＢ３	－２．８０１１
ＮＭ＿００３７４９	インスリン受容体基質２	ＩＲＳ２	－２．９４０４
ＮＭ＿００４５７８	ＲＡＢ４Ａ、メンバーＲＡＳ癌遺伝子ファミリー	ＲＡＢ４Ａ	－３．１２９６
ＮＭ＿００４１７６	ステロール調節要素結合転写因子１	ＳＲＥＢＦ１	－３．５４５５
ＮＭ＿００４９６９	インスリン分解酵素	ＩＤＥ	－４．４８７８
ＮＭ＿００５０２６	ホスホイノシチド－３－キナーゼ、触媒、デルタポリペプチド	ＰＩＫ３ＣＤ	－６．８９７１
ＮＭ＿０００２０８	インスリン受容体	ＩＮＳＲ	－８．６０９９
ＮＭ＿００３３７６	血管内皮成長因子Ａ	ＶＥＧＦＡ	－１５．５１９４
ＮＭ＿００１３１５	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ１４	ＭＡＰＫ１４	－７４．３３６６

【０４２０】

本初期実験の結果は、多種多様のインスリン関連タンパク質のｍＲＮＡレベルが両方向に調節されたことを示す。結果は、糖尿病の処置および／または評価に影響を有するであろうことを指摘する。

【０４２１】

次にさらなる実験を行って、Ｑ１０によって処置したＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞から取得した上の結果を確認した。ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞中の遺伝子の多くが、Ｑ１０処置の早くも６時間後に調節されている。しかし初期調節は、１６時間および２４時間までにより明らかでなくなる。４８時間付近で、我々は糖尿病アレイの多くの遺伝子が再度強力に調節されることを見出している。２つ以上の独立した実験からの一致した結果を下の表１５にまとめる。ＳＣＣ細胞もＱ１０処置の６時間後および２４時間後の両方に、いくつかの遺伝子における調節を呈するように思われる。表１６にはＳＣＣ細胞のこれらの結果をまとめ、表１７にはＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞およびＳＣＣ細胞の両方で調節される遺伝子をまとめる。

【表１５】

表１５　糖尿病アレイによって分析したときの、１００μＭ　Ｑ１０処置によって調節されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞の遺伝子

記号	内容	調節	局在	考えられる機能
ADRB3	アドレナリン作動性、ベーター３ー、受容体	48時間にて下方調節	原形質膜	cAMPシグナル伝達、Gタンパク質シグナル伝達
CEACAM1	癌胎児性抗原関連細胞接着分子1(胆汁糖タンパク質)	48時間にて下方調節	細胞外空間	抗アポトーシス性、血管形成の正の調節
CEBPA	CCAAT／エンハンサ結合タンパク質(C／EBP)、アルファ	48時間にて上方調節	核	グルココルチコイド受容体シグナル伝達、VDR／RXR活性化
CTLA4	細胞傷害性Tーリンパ球関連タンパク質4	48時間にて下方調節	原形質膜	T細胞受容体シグナル伝達、CASP8を活性化する
DUSP4	2重特異性ホスファターゼ4	48時間にて下方調節	核	ホスファターゼ
ENPP1	エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ1	48時間にて下方調節	原形質膜	インスリン受容体経路の負の調節因子
FOXC2	フォークヘッドボックスC2(MFHー1、間充織フォークヘッド1)	48時間にて下方調節	核	抗アポトーシス性、転写因子
G6PD	グルコースー6ーリン酸デヒドロゲナーゼ	48時間にて上方調節、次に下方調節	細胞質	ペントースリン酸経路、グルタチオン代謝
HMOX1	ヘムオキシゲナーゼ(デサイクリング)1	48時間にて下方調節	細胞質	ヘムオキシゲナーゼデサイクリング
ICAM1	細胞間接着分子1(CD54)、ヒトライノウイルス受容体	48時間にて下方調節	原形質膜	アトロバスタチンによって調節され、いくつかのカスパーゼを処理する
IL4R	インターロイキン4受容体	48時間にて下方調節	原形質膜	TP73による上方調節、IRS1およびIRS2に結合する
IRS1	インスリン受容体基質1	48時間にて上方調節、次に下方調節	原形質膜	インスリン受容体を結合
IRS2	インスリン受容体基質2	48時間にて下方調節	原形質膜	IGFー1シグナル伝遼
NSF	Nーエチルマレイミド感受性因子	48時間にて下方調節	細胞質	GABAシグナル伝達
PIK3CD	ホスホイノシチドー3ーキナーゼ、触媒、デルタポリペプチド	48時間にて下方調節	細胞質	キナーゼ
PPARG	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ	48時間にて下方調節	核	転写因子
PRKCB1	タンパク質キナーゼC、ベータ1	48時間にて下方調節	細胞質	PKCファミリー
SELL	セレクチンL(リンパ球接着分子1)	48時間にて下方調節	原形質膜	RAS、MAPKを活性化する
SREBF1	ステロール調節要素結合転写因子1	48時間にて上方調節、次に下方調節	核	転写因子
STXBP1	シンタキシン結合タンパク質1	48時間にて下方調節	細胞質	ミエリン濃縮画分中に存在
TGFB1	形質転換成長因子、ベータ1	48時間にて上方調節、次に下方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
NKX2ー1	NK2ホメオボックス1	48時間にて下方調節	核	転写アクチベーター
TNF	腫瘍壊死因子(TNFスーパーファミリー、メンバー2)	48時間にて上方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
TNFRSF1A	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー1A	72時間にて下方調節	原形質膜	アポトーシス促進性
VEGFA	血管内皮成長因子A	58時間にて上方調節、次に下方調節	細胞質	キナーゼ

【表１６】

表１６　糖尿病アレイによって分析したときの、１００μＭ　Ｑ１０処置によって調節されたＳＣＣ細胞の遺伝子

記号	内容	調節
Ｇ６ＰＤ	グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ	６時間にて下方調節
ＩＣＡＭ１	細胞間接着分子１（ＣＤ５４）、ヒトライノウイルス受容体	６時間にて下方調節
ＩＮＰＰＬ１	イノシトールポリリン酸ホスファターゼ様１	６時間にて下方調節
ＮＯＳ３	１酸化窒素シンターゼ３（内皮細胞）	６時間にて下方調節
ＰＩＫ３ＣＤ	ホスホイノシチド－３－キナーゼ、触媒、デルタポリペプチド	６時間にて下方調節
ＰＰＡＲＡ	ペルオキシソーム増殖活性化受容体、アルファ	６時間にて下方調節
ＰＹＧＬ	ホスホリラーゼ、グリコーゲン；肝臓（エール病、グリコーゲン蓄積病ＶＩ型）	６時間にて下方調節
ＳＲＥＢＦ１	ステロール調節要素結合転写因子１	６時間にて下方調節
ＳＴＸＢＰ２	シンタキシン結合タンパク質２	６時間にて下方調節
ＴＮＦ	腫瘍壊死因子（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー２）	６時間にて下方調節
ＴＮＦＲＳＦ１Ａ	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１Ａ	６および２４時間にて下方調節
ＶＥＧＦＡ	血管内皮成長因子Ａ	６時間にて下方調節

【表１７】

表１７　ＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞およびＳＣＣ細胞の両方で１００μＭ　Ｑ１０処置によって調節された糖尿病アレイからの遺伝子

記号	内容
Ｇ６ＰＤ	グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ
ＩＣＡＭ１	細胞間接着分子１（ＣＤ５４）、ヒトライノウイルス受容体
ＰＩＫ３ＣＤ	ホスホイノシチド－３－キナーゼ、触媒、デルタポリペプチド
ＳＲＥＢＦ１	ステロール調節要素結合転写因子１
ＴＮＦ	腫瘍壊死因子（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー２）
ＴＮＦＲＳＦ１Ａ	腫瘍壊死因子　受容体スーパーファミリー、メンバー１Ａ
ＶＥＧＦＡ	血管内皮成長因子Ａ

【０４２２】

多種多様のインスリン関連タンパク質のｍＲＮＡレベルが両方向に調節された。Ｑ１０は細胞代謝に対して影響を有し、それゆえ糖尿病などの代謝調節疾患に影響する。著しく調節された２種類のタンパク質について、下でさらに述べる。

【０４２３】

マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ１４（ＭＡＰＫ１４）：マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ１４（ＭＡＰＫ１４）は、ＭＡＰキナーゼファミリーのメンバーである。ＭＡＰキナーゼは、複数の生化学シグナルの統合点として作用し、増殖、分化、転写調節および発生などの多岐にわたる細胞プロセスに関与している。本実験の結果は、ＭＡＰＫ１４が著しく下方調節されたことを示す。

【０４２４】

肝細胞核因子４、アルファ（ＨＮＦ４Ａ）：ＨＮＦ４（肝細胞核因子４）は、肝臓発生に不可欠である肝臓、腸、腎臓、および膵臓ベータ細胞で大部分が発現される核受容体タンパク質である。ヒトにおいては、２種類の別々の遺伝子ＨＮＦ４ＡおよびＨＮＦ４Ｇによってそれぞれコードされた ＮＨＦ４の２種類のアイソフォーム、アルファおよびガンマがある（例えばＣｈａｒｔｉｅｒ　ＦＬ，Ｂｏｓｓｕ　ＪＰ，Ｌａｕｄｅｔ　Ｖ，Ｆｒｕｃｈａｒｔ　ＪＣ，Ｌａｉｎｅ　Ｂ（１９９４）．“Ｃｌｏｎｉｎｇ　ａｎｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｏｆ　ｃＤＮＡｓ　ｅｎｃｏｄｉｎｇ　ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ　ｎｕｃｌｅａｒ　ｆａｃｔｏｒ　４　ｉｎｄｉｃａｔｅ　ｔｈｅ　ｐｒｅｓ

ｅｎｃｅ ｏｆ ｔｗｏ ｉｓｏｆｏｒｍｓ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｌｉｖｅｒ”．Ｇｅｎｅ １４７（２）：２６９－７２を参照）。

【０４２５】

ＨＮＦ４は当初、オーファン受容体として分類された。しかしＨＮＦ４は後に、多種多様の脂肪酸に連続的に結合されるために構成的に活性であることが見出された（例えばＳｌａｄｅｋ Ｆ（２００２）．“Ｄｅｓｐｅｒａｔｅｌｙ ｓｅｅｋｉｎｇ．．．ｓｏｍｅｔｈｉｎｇ”．Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ １０（２）：２１９－２２１およびＪｕｍｐ ＤＢ，Ｂｏｔｏｌｉｎ Ｄ，Ｗａｎｇ Ｙ，Ｘｕ Ｊ，Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ Ｂ，Ｄｅｍｅｕｒｅ Ｏ（２００５）．“Ｆａｔｔｙ ａｃｉｄ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｅｐａｔｉｃ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ”．Ｊ Ｎｕｔｒ １３５（１１）を参照）。ＨＮＦ４のリガンド結合ドメインは、他の核受容体と同様に、基準（ｃａｎｏｎｉｃａｌ）アルファらせんサンドイッチフォールディングを取り（例えばＷｉｓｅｌｙ ＧＢ，Ｍｉｌｌｅｒ ＡＢ，Ｄａｖｉｓ ＲＧ，Ｔｈｏｒｎｑｕｅｓｔ ＡＤ Ｊｒ，Ｊｏｈｎｓｏｎ Ｒ，Ｓｐｉｔｚｅｒ Ｔ，Ｓｅｆｌｅｒ Ａ，Ｓｈｅａｒｅｒ Ｂ，Ｍｏｏｒｅ ＪＴ，Ｍｉｌｌｅｒ ＡＢ，Ｗｉｌｌｓｏｎ^{TM}，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＳＰ（２００２）．“Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ ４ ｉｓ ａ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ ｔｈａｔ ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅｌｙ ｂｉｎｄｓ ｆａｔｔｙ ａｃｉｄｓ”．Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ １０（９）：１２２５－３４およびＤｈｅ－Ｐａｇａｎｏｎ Ｓ，Ｄｕｄａ Ｋ，Ｉｗａｍｏｔｏ Ｍ，Ｃｈｉ ＹＩ，Ｓｈｏｅｌｓｏｎ ＳＥ（２００２）．“Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ ＨＮＦ４ ａｌｐｈａ ｌｉｇａｎｄ ｂｉｎｄｉｎｇ ｄｏｍａｉｎ ｉｎ ｃｏｍｐｌｅｘ ｗｉｔｈ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｆａｔｔｙ ａｃｉｄ ｌｉｇａｎｄ”．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７（４１）：３７９７３－６を参照）、コアクチベータータンパク質と相互作用する（例えばＤｕｄａ Ｋ，Ｃｈｉ ＹＩ，Ｓｈｏｅｌｓｏｎ ＳＥ（２００４）．“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｂａｓｉｓ ｆｏｒ ＨＮＦ－４ａｌｐｈａ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｂｙ ｌｉｇａｎｄ ａｎｄ ｃｏａｃｔｉｖａｔｏｒ ｂｉｎｄｉｎｇ”．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７９（２２）：２３３１１－６に概説されている）。

【０４２６】

ＨＮＦ４－α遺伝子の突然変異は、若年発症成人型糖尿病（ＭＯＤＹ）と結び付けられてきた（例えばＦａｊａｎｓ ＳＳ，Ｂｅｌｌ ＧＩ，Ｐｏｌｏｎｓｋｙ ＫＳ（２００１）“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｍａｔｕｒｉｔｙ－ｏｎｓｅｔ ｄｉａｂｅｔｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ｙｏｕｎｇ”．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３４５（１３）：９７１－８０を参照）。

【０４２７】

肝細胞核因子４（ＨＮＦ４）は、肝細胞および膵臓細胞において多数の遺伝子を調節することが公知の組織特異的転写因子である。ＨＮＦ４は腎臓のいくつかの部位で高度に発現されることが公知であるが、本器官におけるその役割についておよび腎臓細胞におけるＨＮＦ４調節遺伝子についてはほとんど知られていない。ＨＮＦ４の存在量および活性は腎臓細胞癌腫（ＲＣＣ）では頻繁に低下し、腎臓細胞におけるＨＮＦ４の多少の腫瘍抑制機能を示す。興味深いことに、ＨＮＦ４によって調節された遺伝子の多くは、ＲＣＣマイクロアレイ試験では調節解除されることが示されている。これらの遺伝子（ＡＣＹ１、ＷＴ１、ＳＥＬＥＮＢＰ１、ＣＯＢＬ、ＥＦＨＤ１、ＡＧＸＴ２Ｌ１、ＡＬＤＨ５Ａ１、ＴＨＥＭ２、ＡＢＣＢ１、ＦＬＪ１４１４６、ＣＳＰＧ２、ＴＲＩＭ９およびＨＥＹ１）は、ＲＣＣにおけるＨＮＦ４の低下時に活性が変化する遺伝子の良好な候補である。

【０４２８】

ＨＮＦ４アルファのリガンド結合ドメインの構造において（１Ｍ７Ｗ．ｐｄｂ；Ｄｈｅ－Ｐａｇａｎｏｎ（２００２）ＪＢＣ，２７７，３７９７３）；小型脂質が観察され、大腸菌産生から同時精製された。結晶はタンパク質の２種類の立体配座を含有し、ここで伸

長らせん１０および短らせん１２が交互の立体配座を有している。脂質結合領域の検査時に、興味深いことに、２つの出口領域があることが見出された。一方の領域は小型脂質の頭基を保持して、複数のポケット領域が本出口ポートと共局在していることが注目される。仮説は、Ｑ１０が本転写因子に特異的に結合するということである。本脂質結合トンネル中にモデル化されるとき、Ｑ１０環は表面ポケット中に適合するであろう（図２８）。公知の機能喪失型突然変異（Ｅ２７６Ｑ）は、本表面ポケットを裏打ちするように残基を配列する潜在能を有し、それゆえ推定上のＱ１０結合に悪影響を有するであろう。

【０４２９】

加えて、本Ｑ１０結合モデルによって、疎水性尾部は内部空洞から延出して、次に伸長らせん１０と相互作用するであろう。それゆえ、本相互作用は、らせん１０／１２基の立体配座を潜在的に改変することができる。このことは次に、転写因子活性の活性化／不活性化平衡を改変し得る。

【０４３０】

実施例７：抗体マイクロアレイ分析

Ｑ１０の存在によるタンパク質濃度の評価を、抗体マイクロアレイ法の利用によって評価した。マイクロアレイは、７００超のタンパク質の抗体を含有し、広範囲のタンパク質タイプおよび潜在的な経路マーカーをサンプリングした。

【０４３１】

Ｑ１０によって処置された細胞におけるタンパク質濃度レベルの変化を影響評価するための初期実験は、抗体マイクロアレイ（Ｐａｎｏｒａｍａ　ＸＰ７２５抗体アレイ、Ｓｉｇｍａ）および6時間または２４時間処置したＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞を用いて行った。細胞を収集および抽出して、可溶性タンパク質上清を取得した。各試料（１ｍｇ／ｍＬの）からのタンパク質の２つの分量（合計約１ｍｇ）を蛍光染料（それぞれＣｙ３およびＣｙ５）によってそれぞれ標識した。過剰な染料をタンパク質から除去して、材料をマイクロアレイインキュベーションに利用した。２つの時点の試料を比較するために、等量のタンパク質を異なる標識タイプである各試料と混合した（例えばＣｙ３で標識された3時間抽出物を、Ｃｙ５で標識された２４時間抽出物と混合した）。（メーカーの推奨プロトコルに従った）マイクロアレイチップによるインキュベーション後に、チップを洗浄および乾燥した。マイクロアレイを蛍光レーザスキャナによってスキャンして、Ｃｙ３およびＣｙ５染料の相対蛍光強度を測定した。

【表１８】

表１８　５０μＭ　Ｑ１０による２４時間処置後のＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞においてレベルが上昇したタンパク質

名称	比
Ｃｄｋ１	０．１
ＤｃＲ１	０．１
タンパク質キナーゼＣｂ２	０．１
腫瘍壊死因子可溶性受容体ＩＩ	０．１
ＢＡＤ	０．１
カスパーゼ１３	０．２
ＦＢＩ１パケモン	０．２
ザイキシン	０．２
Ｃｄｃ２５Ａ	０．３
ＰＩＡＳｘ	０．３
神経成長因子ｂ	０．３
タンパク質チロシンホスファターゼＰＥＳＴ	０．３
ｈＢＲＭ　ｈＳＮＦ２ａ	０．４
ＧＲＰ９４	０．４
カルモジュリン	０．４
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ２Ｃａｂ	０．４
ＡＲＣ	０．４
ニューラビンＩＩ	０．４
１酸化窒素シンターゼｂＮＯＳ	０．４
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ１ｂ	０．４

名称	比
熱ショックタンパク質１１０	０．４
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ１ｇ１	０．４
ＣＯＸＩＩ	０．５
ＨＳＰ７０	０．５
ＢＬＫ	０．５
サイトケラチン８１２	０．５
ＢＵＢＲ１	０．５
ＦＯＸＣ２	０．５
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ２ＡＢｇ	０．５
ＭＳＨ６	０．５
ＤＲ６	０．５
Ｒａｄ１７	０．５
ＢＡＦ５７	０．５
形質転換成長因子ｂ　ｐａｎ	０．５
ＢＴＫ	０．５
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ２Ａ／Ｂ　ｐａｎ２	０．５
ＣＮＰアーゼ	０．５
ＳｙｎＣＡＭ	０．５
増殖細胞核抗原	０．５

【表１９】

表１９　５０μＭ　Ｑ１０による２４時間処置後のＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞においてレベルが上昇したタンパク質

名称	比
ＢｃｌｘＬ	４．２
ＢＩＤ	３．７
Ｂｍｆ	３．７
ＰＵＭＡ　ｂｂｃ３	３．０
Ｚｉｐキナーゼ	２．８
Ｂｍｆ	２．８
ＤｃＲ２	２．７
Ｅ２Ｆ１	２．７
ＦＡＫ　ｐＴｙｒ５７７	２．５
ＦＫＨＲＬ１　ＦＯＸＯ３ａ	２．５
ＭＴＢＰ	２．５
コネキシン３２	２．５
アネキシンＶＩＩ	２．４
ｐ６３	２．４
ＳＵＭＯ１	２．４
Ｉアファディン	２．３
ＭＤＭＸ	２．３
Ｐｙｋ２	２．３
ＲＩＰ受容体共役タンパク質	２．３
ＲＩＣＫ	２．３
ＩＫＫａ	２．３
Ｂｃｌｘ	２．３
アファディン	２．２
増殖細胞　タンパク質　Ｋｉ６７	２．２
ヒストン　Ｈ３　ｐＳｅｒ２８	２．２
ＣＡＳＫ　ＬＩＮ２	２．２
セントリン	２．２
ＴＯＭ２２	２．１
１酸化窒素シンターゼ内皮ｅＮＯＳ	２．１
タンパク質キナーゼＢａ	２．１
ラミニン	２．１
ミオシンＩｂ核	２．１
カスパーゼ７	２．１
ＭＡＰキナーゼ２　ＥＲＫ２	２．１
ＫＩＦ１７	２．１

名称	比
クラスピン	２．１
ＧＲＰ７５	２．１
カスパーゼ６	２．１
ＩＬＰ２	２．１
ａアクチニン	２．１
ビトロネクチン	２．１
ＤＲＡＫ１	２．１
ＰＴＥＮ	２．１
Ｇｒｂ２	２．１
ＨＤＡＣ４	２．０
ＨＤＡＣ７	２．０
１酸化窒素シンターゼｂＮＯＳ	２．０
ＨＤＡＣ２	２．０
ｐ３８　ＭＡＰＫ	２．０
リーリン	２．０
タンパク質キナーゼＣｄ	２．０
ｃｅｒｂＢ３	２．０
ｈＳＮＦ５　ＩＮＩ１	２．０
タンパク質キナーゼＣａ	２．０
グルタミン酸受容体ＮＭＤＡＲ２ａ	２．０
レプチン	２．０
ジメチルヒストン　Ｈ３　ジＭｅＬｙｓ４	２．０
ＢＩＤ	２．０
ＭｅＣＰ２	２．０
神経成長因子受容体　ｐ７５	２．０
ミオシン軽鎖キナーゼ	２．０
ｃＲａｆ　ｐＳｅｒ６２１	２．０
ＧＲＰ７８　ＢｉＰ	２．０
ｃＭｙｃ	２．０
Ｒａｆ１	２．０
ＭＴＡ２　ＭＴＡ１Ｌ	２．０
Ｓｉｒ２	２．０
ＡＴＦ２　ｐＴｈｒ６９　７１	２．０
タンパク質キナーゼＣ	２．０
タンパク質キナーゼＣｂ２	２．０

【０４３２】

先に観察されたアポトーシスタンパク質を確認するために、およびより多数のアポトーシス促進および抗アポトーシスタンパク質への評価を拡張するために、潜在的に包含される広範なタンパク質のファミリーをスクリーニングすることができる２種類のアッセイ方法を選定した。

【０４３３】

第１に、抗体マイクロアレイ（Ｐａｎｏｒａｍａ　ＸＰ７２５抗体アレイ，Ｓｉｇｍａ）を利用して７００超のタンパク質抗体をスクリーニングし、５０μＭ　Ｑ１０によって２４時間処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞におけるタンパク質濃度レベルの変化を影響評価した。

【０４３４】

以下は、Ｑ１０（２４時間）を用いたＳＫＭＥＬ－２８に対する抗体アレイ実験からのレベルの改変を有する同定されたタンパク質の一部である：Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｂｍｆ、ＢＴＫ、ＢＬＫ、ｃＪｕｎ（ｐＳｅｒ６３）、コネキシン３２、ＰＵＭＡ　ｂｂｃ３、ＢＩＤ、Ｐａｒ４、ｃＣｂｌ。本初期試験からの主な結論は、予想されたアポトーシス促進タンパク質が改変されたことであった。

【０４３５】

ＳＫ－ＭＥＬ－２８の抗体マイクロアレイ

抗体マイクロアレイ（Ｐａｎｏｒａｍａ　ＸＰ７２５抗体アレイ，Ｓｉｇｍａ）を利用して７００超のタンパク質抗体をスクリーニングし、５０μＭ　Ｑ１０によって２４時間処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞におけるタンパク質濃度レベルの変化を影響評価した。

【表２０】

表２０　５０μＭ　Ｑ１０によって処置されたＳＫＭＥＬ－２８におけるタンパク質レベルの変化

名称	抗体番号（Ｓｉｇｍａ）	ＳＫＭＥＬ２８　Ｑ１０／ＳＫＭＥＬ２８対照	ＳＫＭＥＬ２８／ＨＥＫａ対照	ＨＥＫａ　Ｑ１０／ＨＥＫａ対照
ＢｃｌｘＬ	Ｂ９４２９	２．４６	１．０４	１．８３
ＰＵＭＡ　ｂｂｃ３	Ｐ４７４３	２．３１	１．１４	２．１４
Ｂｍｆ	Ｂ１５５９	２．２３	１．１２	２．１１
Ｂｍｆ	Ｂ１６８４	２．０９	１．１３	１．７４
ｃＪｕｎ　ｐＳｅｒ６３	Ｊ２１２８	１．９９	１．１４	１．８５
ＢＬＫ	Ｂ８９２８	１．９４	１．０５	１．５１

【０４３６】

以下は、Ｑ１０（２４時間）を用いたＳＫＭＥＬ－２８に対する抗体アレイ実験からのレベルの改変を有する同定されたタンパク質の一部である：Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｂｍｆ、ＢＴＫ、ＢＬＫ、ｃＪｕｎ（ｐＳｅｒ６３）、コネキシン３２、ＰＵＭＡ　ｂｂｃ３、ＢＩＤ、Ｐａｒ４、ｃＣｂｌ。これらのデータは、外部から添加されたＱ１０のレベルの上昇により、アポトーシス促進タンパク質のレベルがインキュベーション時に改変されることを確認している。

【０４３７】

Ｂｃｌ－ｘｌ（「基底細胞リンパ腫－特大」）は、ミトコンドリア中の膜貫通分子である。Ｂｃｌ－ｘｌは、ＦＡＳ－Ｌのシグナル伝達経路に関与し、タンパク質のＢｃｌ－２ファミリーのメンバーである複数の抗アポトーシスタンパク質の１つである。Ｂｃｌ－ｘｌは、癌細胞の生存に関わってきた。しかし、ヒトＢｃｌ－ｘｍＲＮＡの選択的スプライシングが少なくとも２種類の別個のＢｃｌ－ｘｍＲＮＡ種、Ｂｃｌ－ｘＬおよびＢｃｌ－ｘＳを生じ得ることが公知である。優勢なタンパク質生成物（２３３アミノ酸）は、成長因子除去時に細胞死を阻害する、より大型のＢｃｌ－ｘ　ｍＲＮＡであるＢｃｌ－ｘＬである（Ｂｏｉｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３．Ｃｅｌｌ　７４，５９７－６０８）。他方では、Ｂｃｌ－ｘＳは、Ｂｃｌ－２が細胞死を阻害する能力を阻害して、細胞をアポトーシス細胞死に対して感受性にする。

【表２１】

表２１　１００μＭ　Ｑ１０による２４時間処置後のＳＣＣ細胞においてレベルが上昇したタンパク質

名称	比
ＰＵＭＡ　ｂｂｃ３	３．８１
ＨＤＡＣ７	３．２１
ＢＩＤ	３．１２
ＭＴＢＰ	３．００
ｐ３８　ＭＡＰキナーゼ非活性化	２．９３
ＰＫＲ	２．８７
ＴＲＡＩＬ	２．８６
ＤＲ５	２．８６
Ｃｄｋ３	２．８２
Ｎカドヘリン	２．７１
リーリン	２．６８
ｐ３５　Ｃｄｋ５調節因子	２．６３
ＨＤＡＣ１０	２．６０
ＲＡＰ１	２．５９
ＰＳＦ	２．５６
ｃＭｙｃ	２．５５
メチルヒストンＨ３　ＭｅＬｙｓ９	２．５４
ＨＤＡＣ１	２．５１
Ｆ１Ａ	２．４８
ＲＯＣＫ１	２．４５
Ｂｉｍ	２．４５
ＦＸＲ２	２．４４
ＤＥＤＡＦ	２．４４
ＤｃＲ１	２．４０
ＡＰＲＩＬ	２．４０
ＰＲＭＴ１	２．３６
Ｐｙｋ２　ｐＴｙｒ５８０	２．３４
ビトロネクチン	２．３３
シナプトポディン	２．３２
カスパーゼ１３	２．３０
シンタキシン８	２．２９
ＤＲ６	２．２９
ＢＬＫ	２．２８
ＲＯＣＫ２	２．２８

名称	比
Ｓｉｒ２	２．２５
ＤｃＲ３	２．２４
ＲｂＡｐ４８　ＲｂＡｐ４６	２．２１
ＯＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ	２．２１
ＧＲＰ７８　ＢｉＰ	２．２０
Ｓｉｎ３Ａ	２．２０
ｐ６３	２．２０
プレセニリン１	２．１９
ＰＭＬ	２．１８
ＰＡＫ１ｐＴｈｒ２１２	２．１７
ＨＤＡＣ８	２．１６
ＨＤＡＣ６	２．１５
１酸化窒素シンターゼ誘導性ｉＮＯＳ	２．１５
ニューロフィブロミン	２．１５
シンタキシン６	２．１３
パーキン	２．１２
Ｒａｄ１７	２．１１
１酸化窒素シンターゼｂＮＯＳ	２．１０
ＴＩＳ７	２．０９
ＯＰ１８スタスミン（スタスミン１／癌タンパク質１８）	２．０８
ホスホｂーカテニン　ｐＳｅｒ４５	２．０７
ニューラビンＩＩ	２．０７
ｅチューブリン	２．０７
ＰＫＢ　ｐＴｈｒ３０８	２．０７
オルニチンデカルボキシラーゼ	２．０７
Ｐ５３　ＢＰ１	２．０６
Ｐｙｋ２	２．０５
ＨＤＡＣ５	２．０５
コネキシン４３	２．０５
ａ１シントロフィン	２．０４
ＭＲＰ１	２．０４
ｃｅｒｂＢ４	２．０３
Ｓニトロソシステイン	２．０３
ＳＧＫ	２．０２
Ｒａｂ５	２．０１
ユビキチンＣ末端ヒドロラーゼＬ１	２．０１
ミオシンＩｂ核	２．００
Ｐａｒ４前立腺アポトーシス応答４	２．００

【表２２】

表２２　１００μＭ　Ｑ１０による２４時間処置後のＳＣＣ細胞においてレベルが減少したタンパク質

名称	比
ＡＰ１	０．６８
セントリン	０．５５
ＣＵＧＢＰ１	０．６７
シスタチンＡ	０．６９
サイトケラチンＣＫ５	０．６０
フィブロネクチン	０．６３
ｇパルビン	０．７０
成長因子非依存性１	０．６３
神経成長因子ｂ	０．６０
プロカスパーゼ８	０．７２
Ｒａｂ７	０．６２
Ｒａｂ９	０．７３
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ１ｇ１	０．７１
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ２ＡＢｇ	０．７３
ＳＫＭ１	０．７０
ＳＬＩＰＲ　ＭＡＧＩ３	０．６７
スペクトリンａおよびｂ	０．７０
Ｓｐｒｅｄ２	０．６６
ＴＲＦ１	０．７４

【０４３８】

実施例８：ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロットおよび２次元ゲル電気泳動によって処理および評価された第１の実験を皮膚癌株化細胞ＳＫＭＥＬ－２８に対して行った。本実験セットは、５０または１００μＭ　Ｑ１０によって３、６、１２、および２４時間処置されたＳＫ－ＭＥＬ－２８細胞を包含していた。

【０４３９】

多種多様の細胞タイプを、Ｂｃｌ－ｘＬの抗体（図１４）、ビメンチンの抗体（図１５）、ミトコンドリア酸化的リン酸化機能の一連の抗体（図１６～２１）およびミトコンドリア膜完全性に関連する一連の抗体（図２２～２７）に対してウェスタンブロット分析によって評価した。これらの実験による結果は、複数の検査されたタンパク質がＱ１０による細胞処置の結果として上方調節または下方調節されることを証明した。

【０４４０】

実施例９：１００ｕｍ　Ｑ１０による膵臓癌細胞（ＰａＣａ２）の処置によってｍＲＮＡレベルが調節されているとして同定された糖尿病関連遺伝子

１００ｕＭ　Ｑ１０によって処置された試料に、処置後の各種の時間に糖尿病アレイを実行した。実験は本質的に上記のように実施された。Ｑ１０処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表２３に要約される。これらの結果は、以下の遺伝子がＱ１０処理によって調節されることを示した：ＡＢＣＣ８、ＡＣＬＹ、ＡＤＲＢ３、ＣＣＬ５、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＥＢＲＡ、ＦＯＸＧ１、ＦＯＸＰ３、Ｇ６ＰＤ、ＧＬＰ１Ｒ、ＧＰＤ１、ＨＮＦ４Ａ、ＩＣＡＭ１、ＩＧＦＢＰ５、ＩＮＰＰＬ１、ＩＲＳ２、ＭＡＰＫ１４、ＭＥ１、ＮＦＫＢ１、ＰＡＲＰ１、ＰＩＫ３Ｃ２Ｂ、ＰＩＫ３ＣＤ、ＰＰＡＲＧＣ１Ｂ、ＰＲＫＡＧ２、ＰＴＰＮ１、ＰＹＧＬ、ＳＬＣ２Ａ４、ＳＮＡＰ２５、ＨＮＦ１Ｂ、ＴＮＲＦＳＦ１Ａ、ＴＲＩＢ３、ＶＡＰＡ、ＶＥＧＦＡ、ＩＬ４ＲおよびＩＬ６。

【表２３】

表２３　その発現が１００μＭのＱ１０で調節される糖尿病アレイ由来の遺伝子と、細胞中でのそれらの考えられる機能。

アップレギュレートされたもの（灰色）とダウンレギュレートされたもの（白色）。

遺伝子の名称	遺伝子の機能
ＡＤＲＢ	ｃＡＭＰシグナル伝達、Ｇタンパク質シグナル伝達
ＣＣＬ５	ＣＣＲ５の天然リガンドおよびＴＮＦによって調節される
ＣＥＡＣＡＭ１	抗アポトーシス性、血管形成の正の調節
ＧＬＰＲ１	膵臓からのインスリン分泌を上昇させ、グルカゴン分泌を低下させる
ＧＰＤ１	炭水化物代謝、ＮＡＤＨ酸化
ＩＣＡＭ１	アトロバスタチンによって調節され、いくつかのカスパーゼを処理する
ＭＡＰＫ１４	ＤＮＡ損傷チェックポイント、血管形成、グルコース代謝プロセス
ＰＡＲＰ１	ＤＮＡ修復、ＴＰ５３、ＮＯＳ２Ａ、ＮＦＫＢ、テロメア維持を調節する
ＰＩＫ３Ｃ２Ｂ	ホスホイノシチド媒介シグナル伝達、ＡＫＴおよびＡＫＴ１を調節する
ＰＩＫ３ＣＤ	キナーゼ
ＰＹＧＬ	炭水化物代謝、グリコーゲンおよびグリコーゲンシンターゼを調節する
ＳＬＣ２Ａ４	グルコースを調節し、ＩＮＳおよびインスリンによって調節される
ＳＮＡＰ２５	インスリン分泌、神経伝達物質（ｎｅｒｏｔｒａｎｓｍｉｔｔｅｒ）取り込みの調節
ＣＥＢＰＡ	グルココルチコイド受容体シグナル伝達、ＶＤＲ／ＲＸＲ活性化
ＦＯＸＰ３	ＩＬ４、ＩＬ２を調節する
Ｇ６ＰＤ	ペントースリン酸経路、グルタチオン代謝
ＩＧＦＢＰ５	細胞成長の調節、ＩＧＦ１によって調節される
ＩＮＰＰＬ１	Ａｋｔおよびグリコーゲンを調節する
ＩＲＳ２	ＩＧＦ－１シグナル伝達
ＭＥ１	リンゴ酸を調節して、Ｔ３によって調節される
ＮＦＫＢ１	ＩＬ６およびＴＮＦを調節する
ＰＰＡＲＧＣ１Ｂ	ＭＡＰＫ１４によって調節される
ＰＲＫＡＧ２	脂肪酸、コレステロール生合成
ＰＴＰＮ１	ＪＡＫ２およびＥＧＦ受容体キナーゼを脱リン酸化する
ＶＥＧＦＡ	キナーゼ、血管形成
ＩＬ４Ｒ	ＴＰ７３による上方調節、ＩＲＳ１およびＩＲＳ２に結合する
ＨＮＦ１Ｂ	ＨＮＦ４Ａ
ＴＮＦＲＳＦ１Ａ	アポトーシス促進性
ＴＲＩＢ３	ＡＫＴ１およびＮＦｋＢの負の調節因子を調節する
ＶＡＰＡ	ＮＦｋＢ、ベシクル輸送を調節する

【０４４１】

実施例１０：１００μＭ　Ｑ１０を用いる膵臓癌細胞（ＰａＣａ２）の処理によってｍＲＮＡレベルが調節されるとして同定される血管形成関連遺伝子

処理後の様々な時点において１００μＭ　Ｑ１０で処理された試料について血管形成アレイが実行された。実験は本質的に上記のように実施された。Ｑ１０処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表２４に要約される。これらの結果は、以下の遺伝子がＱ１０処理によって調節されることを示した：ＡＫＴ１、ＡＮＧＰＴＬ４、ＡＮＧＰＥＰ、ＣＣＬ２、ＣＤＨ４、ＣＸＣＬ１、ＥＤＧ１、ＥＦＮＡ３、ＥＦＮＢ２、ＥＧＦ、ＦＧＦ１、ＩＤ３、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ８、ＫＤＲ、ＮＲＰ１、ＰＥＣＡＭ１、ＰＲＯＫ２、ＳＥＲＰＩＮＦ１、ＳＰＨＫ１、ＳＴＡＢ１、ＴＧＦＢ１、ＶＥＧＦＡ、およびＶＥＧＦＢ。

【表２４】

表２４　その発現が１００μＭのＱ１０で調節される血管形成アレイ由来の遺伝子と、細胞中でのそれらの考えられる機能のリスト。

アップレギュレートされたもの（灰色）とダウンレギュレートされたもの（白色）。

遺伝子	遺伝子の機能
ＡＮＧＰＴＬ４	抗血管形成、アポトーシスの負の調節因子、脂質代謝
ＣＤＨ５	血管成熟、細胞接着、細胞増殖の負の調節因子
ＦＧＦ１	細胞接着、細胞増殖
ＡＫＴ１	炭水化物代謝プロセス、グリコーゲン生合成プロセス、グルコース代謝プロセス、インスリン受容体シグナル伝達経路、アポトーシス促進性遺伝子産物の活性化、アポトーシス性ミトコンドリア変化
ＡＮＰＥＰ	タンパク質分解、多細胞生物発生、細胞分化
ＣＣＬ２	走化性、抗アポトーシス、ＪＡＫ－ＳＴＡＴカスケード、器官形態形成、ウイルスゲノム複製
ＣＸＣＬ１	走化性、炎症性応答、免疫応答、細胞増殖の負の調節、アクチン細胞骨格組織化および生合成
ＥＤＧ１	細胞増殖の正の調節、神経インパルスの伝達、細胞接着の調節、神経細胞分化、細胞移動の正の調節、Ｒａｓの正の調節
ＥＦＮＢ２	ＶＥＧＦＡによって調節される細胞－細胞神経伝達
ＥＧＦ	ＭＡＰＫＫ活性の活性化、有糸分裂の正の調節、ＤＮＡ複製
ＩＬＩＢ	糖質コルチコイド刺激に対する応答、アポトーシス、シグナル伝達、細胞－細胞シグナル伝達、細胞増殖の負の調節
ＩＬ８	細胞周期停止
ＫＤＲ	ＡＫＴによって調節されるＶＥＧＦ経路
ＮＲＰ１	細胞接着、シグナル伝達、細胞－細胞シグナル伝達、細胞増殖、ＶＥＧＦＡによって調節される
ＰＥＣＡＭ１	細胞接着、ＴＮＦによって調節される
ＰＲＯＫ２	ＭＡＰＫの活性化、抗アポトーシス、細胞増殖、ＡＫＴを調節
ＳＰＨＫ１	抗アポトーシス、細胞増殖、有糸分裂を調節、細胞移動
ＳＴＡＢ１	炎症性応答、細胞接着、受容体媒介エンドサイトーシス、細胞－細胞シグナル伝達、血管形成の負の調節、細菌に対する防御応答
ＶＥＧＦＡ	抗アポトーシス、ＴＮＦを調節、ＨＩＦ１によって調節される

【０４４２】

実施例１１：１００μＭ　Ｑ１０を用いる膵臓癌細胞（ＰａＣａ２）の処理によってｍＲＮＡレベルで調節されるとして同定されるアポトーシス関連遺伝子

処理後の様々な時点において１００μＭ　Ｑ１０で処理された試料についてアポトーシスアレイが実行された。実験は本質的に上記のように実施された。Ｑ１０処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表２５に要約される。これらの結果は、以下の遺伝子がＱ１０処理によって調節されることを示した：ＡＢＬ１、ＡＫＴ１、Ｂｃｌ２Ｌ１、ＢｃｌＡＦ１、ＣＡＳＰ１、ＣＡＳＰ２、ＣＡＳＰ６、ＣＩＤＥＡ、ＦＡＤＤ、ＬＴＡ、ＴＮＦ、ＴＮＦＳＦ１０Ａ、およびＴＮＦＳＦ１０。

【表２５】

表２５　その発現が１００μＭのＱ１０で調節されるアポトーシスアレイ由来の遺伝子と、細胞中でのそれらの考えられる機能のリスト。

アップレギュレートされたもの（灰色）とダウンレギュレートされたもの（白色）。

遺伝子	遺伝子の機能
ＣＡＳＰ１	アポトーシス促進性、ＩＬ１Ｂを調節、ＴＮＦによって調節される
ＣＡＳＰ６	アポトーシス促進性、ＰＡＲＰ、ＭＣＬ１、ＡＰＰを調節
ＴＮＦ	細胞増殖、分化、アポトーシス、脂質代謝、および凝集
ＴＮＦＳＦ１０	アポトーシス促進性、カスパーゼを調節
ＡＢＬ１	Ｂｃｌ２Ｌ１、ＴＰ５３を調節、アポトーシス促進性、アクチン細胞骨格組織化および生合成
ＡＫＴ１	アポトーシス促進性（Ｐｒｏｐ－ａｐｏｐｔｏｔｉｃ）、アポトーシス性ミトコンドリア変化、炭水化物輸送、熱に対する応答、グルコース代謝、ＩＧＦシグナル伝達経路
ＢｃｌＡＦ１	アポトーシス促進性
Ｂｃｌ２Ｌ１	抗アポトーシス性、ミトコンドリアからのシトクロムｃの放出、カスパーゼを調節、ＢＡＤ、ＢＡＸ、ＢＣｌ２Ｌ１１に結合
ＣＡＳＰ２	抗アポトーシス性
ＣＩＤＥＡ	アポトーシス促進性
ＦＡＤＤ	アポトーシス促進性
ＬＴＡ	アポトーシス促進性
ＴＮＦＳＦ１０Ａ	カスパーゼ活性化因子

【０４４３】

実施例１２：肝臓癌（ＨｅｐＧ２）細胞上でのＰＣＲ糖尿病アレイ

ＨｅｐＧ２（肝臓癌）細胞は、２４時間ビヒクルと、または様々な時間の間１００μＭＱ１０のいずれかで処理された。処理は、ＰａＣａ２細胞において利用された手順に従って（上記、実施例９－１１）、ウェルあたり1×10^{5}細胞で開始された。しかし、これらのサンプルから抽出されたＲＮＡの総量は、予測されたものよりも低かった。逆転写は、通常、１μｇの総ＲＮＡ（２６０ｎｍにおける測定によって決定される）を使用して行われる。逆転写あたりに使用できる最大量は８μｌである。ＲＮＡ濃度が低いので、ビヒクル、ならびに１６時間および４８時間Ｑ１０処理された試料を使用するＲＴ－ＰＣＲアレイ分析が、０．４４μｇのＲＮＡを使用して実施された。これらのアレイは、以下の表２６において要約されるように、１００μＭ　Ｑ１０処理を用いる、ＨｅｐＧ２遺伝子調節における傾向およびパターンの初期の分析を提供した。結果は、遺伝子ＰＰＡＲＧＣ１Ａ、ＰＲＫＡＡ１、およびＳＮＡＰ２５の各々が処理の１６時間後に下方調節されたことを示した（それぞれ、約２０倍、６倍、および５倍）。処理後４８時間において、ＰＰＡＲＧＣ１ＡおよびＰＲＫＡＡ１は正常化され、またはわずかに上方調節されたのに対して、ＳＮＡＰ２５は約２倍下方調節された。

【表２６】

表２６　ＨｅｐＧ２細胞が１００μＭ　Ｑ１０で処置されたときの糖尿病アレイにおいて調節される遺伝子のリスト

遺伝子	遺伝子の名称	遺伝子の機能
ＰＰＡＲＧＣ１Ａ	ペルオキシソーム増殖因子－活性化受容体ガンマ、コアクチベーター１アルファ	細胞死、増殖、細胞呼吸、および膜電位に関与
ＰＲＫＡＡ１	プロテインキナーゼ、ＡＭＰ活性化、アルファ１触媒サブユニット	ＴＰ５３を調節し、アポトーシスに関与し、解糖を調節し、代謝酵素活性を調節する
ＳＮＡＰ２５	シナプトソーム関連タンパク質、２５ｋＤａ	分子の輸送、融合、エクソサイトーシス、および放出において役割を果たす

【０４４４】

実施例１３：肝臓癌（ＨＥＰＧ２）細胞上のＰＣＲ血管形成アレイ

ＨｅｐＧ２（肝臓癌）細胞は、２４時間ビヒクルと、または様々な時間の間１００μＭ　Ｑ１０のいずれかで処理された。処理は、ＰａＣａ２細胞において利用された手順に従って（上記、実施例９－１１）、ウェルあたり1×10^{5}細胞で開始された。しかし、これらのサンプルから抽出されたＲＮＡの総量は、予測されたものよりも低かった。逆転写は、通常、１μｇの総ＲＮＡ（２６０ｎｍにおける測定によって決定される）を使用して行われる。逆転写あたりに使用できる最大量は８μｌである。ＲＮＡ濃度が低いので、ビヒクル、ならびに１６時間および４８時間Ｑ１０処理された試料を使用するＲＴ－ＰＣＲアレイ分析が、０．４４μｇのＲＮＡを使用して実施された。これらのアレイは、以下の表２７において要約されるように、１００μＭ　Ｑ１０処理を用いる、ＨｅｐＧ２遺伝子調節における傾向およびパターンの初期の分析を提供した。Ｑ１０処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表２７に要約される。結果は、遺伝子ＡＮＧＰＴＬ３、ＡＮＧＰＴＬ４、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ５、ＥＮＧ、ＭＭＰ２、およびＴＩＭＰ３の各々が処理の１６時間後に上方調節されたことを示した（それぞれ、対照のそれよりも、約５．５倍、３倍、３倍、３．２倍、３倍、３倍、１倍、および６．５倍、６倍および５倍）。ＩＤ３は、Ｑ１０処理の１６時間後に、対照の約５倍下方調節された。処理の４８時間後に、ＡＮＧＰＴＬ３、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ３、ＥＮＧ、およびＴＩＭＰ３はまだ上方調節されたのに対して（それぞれ、対照よりも約３．５倍、１．５倍、３．１７５倍、２倍、および３倍）、ＡＮＧＰＴＬ４、ＣＸＣＬ５、ＩＤ３、およびＭＭＰ２は、対照よりも、それぞれ、約１倍、１倍、２倍、および１８倍下方調節された。

【表２７】

表２７：ＨｅｐＧ２細胞が１００μＭ　Ｑ１０で処理されたときに血管形成アレイにおいて調節される遺伝子のリスト

遺伝子	遺伝子の名称	遺伝子の機能
ＡＮＧＰＴＬ３	アンジオポエチン様３	生物中で優勢に発現、細胞移動および接着において役割を果たす、脂肪酸およびグリセロール代謝を調節
ＡＮＧＰＴＬ４	アンジオポエチン様４	ＰＰＡＲＧによって調節、血管内皮細胞のアポトーシス阻害剤、脂質およびグルコース代謝ならびにインスリン感受性に役割を果たす
ＣＸＣＬ１	ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド１（黒色腫増殖刺激活性、アルファ）	細胞増殖および移動において役割を果たす
ＣＸＣＬ３	ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド３	ケモカイン活性化、肝臓ステラ細胞活性化、移動、増殖
ＣＸＣＬ５	ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド５	ＩＬ１またはＴＮＦＡで刺激されたときにＩＬ８とともに産生される。走化性、移動、増殖における役割
ＥＮＧ	エンドグリン	ＴＧＦＢＲに結合、移動、増殖、結合、および侵襲に関与
ＩＤ３	ＤＮＡ結合３の阻害剤、ドミナントネガティブヘリックスループーヘリックスタンパク質	ＭＭＰ２を調節、ＴＧＦＢ１、ビタミンＤ３、レチノール酸、ＶＥＧＦＡによって調節、アポトーシス、増殖、分化、移動に関与
ＭＭＰ２	マトリックスメタロペプチダーゼ２（ゼラチナーゼＡ、７２ｋＤａ　ゼラチナーゼ、７２ｋＤａＩＶ型コラゲナーゼ）	肝臓星細胞活性化、ＨＩＦ　シグナル伝達、ＴＩＭＰ３に結合、腫瘍形成、アポトーシス、増殖、侵襲、移動、および走化性に関与
ＴＩＭＰ３	ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害剤３	ＭＭＰ２、ＩＣＡＭ１を調節。ＴＧＦＢ、ＥＧＦ、ＴＮＦ、ＦＧＦ、およびＴＰ５３によって調節される。アポトーシス、細胞－細胞接着、および悪性腫瘍に関与

【０４４５】

血管形成のプロセスに関与していることが知られているタンパク質は、ＲＴ－ＰＣＲアレイの構成要素であった。血管形成は、癌細胞が悪性になる決定的なプロセスである。これらのタンパク質のいくつかは糖尿病にも関わりがある。

【０４４６】

ＡＮＧＰＴＬ３およびＡＮＧＰＴＬ４：ＡＮＧＰＴＬ３に関連する文献は、このタンパク質を脂質代謝の調節に関連付けている。特に、この文献（Ｌｉ，Ｃ．Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｌｉｐｉｄｏｌ．２００６　Ａｐｒ；１７（２）：１５２－６）は、アンジオポエチンとアンジオポエチン様タンパク質の両方が類似のドメイン構造を共有することを教示している。ＡＮＧＰＴＬ３および４は、リポタンパク質リパーゼ活性を阻害するこのスーパーファミリーの２つのみのメンバーである。しかし、ＡＮＧＰＴＬ３および４は、複数のレベルで示差的に調節されており、インビボでの冗長でない機能を示唆している。ＡＮＧＰＴＬ３および４は、タンパク質分解的に２つの半分にプロセスされ、核受容体によって示差的に調節されている。ＡＮＧＰＴＬ４のトランスジェニック過剰発現ならびにＡＮＧＰＴＬ３または４のノックアウトは、これらの２つのタンパク質が脂質タンパク質代謝において本質的な役割を果たしていることを実証している：肝臓由来のＡＮＧＰＴＬ３は食事を与えられた状態で主にリポタンパク質リパーゼ活性を阻害するのに対して、ＡＮＧＰＴＬ４は、食事を与えられた状態と絶食状態の両方で重要な役割を果たしている。加えて、ＡＮＧＰＴＬ４は、リポタンパク質誘導脂肪酸の組織特異的送達を調節する。このように、ＡＮＧＰＴＬ４は、発現のその部位に依存して、リポタンパク質リパーゼのエンドクリンまたはオートクリン／パラクリン阻害剤である。

【０４４７】

リポタンパク質リパーゼは、キロミクロンおよび超低密度リポタンパク質（ＶＬＤＬ）

において見い出されるものなどのリポタンパク質中の脂質を、３つの遊離脂肪酸と１つのグリセロール分子に加水分解する酵素である。所定の組織中でのリポタンパク質リパーゼ活性は、トリグリセリド誘導脂肪酸の取り込みのための律速段階である。脂肪酸の分配のバランスの悪さは、大きな代謝的な結果を有する。高脂肪食はＬＰＬの組織特異的過剰発現を引き起こすことが示されており、これは、組織特異的インスリン抵抗性および結果としての２型糖尿病の発症に関わってきた。

【０４４８】

本実施例の結果は、Ｑ１０が脂質代謝に関わっている調節タンパク質であり、したがって、ＡＮＧＰＴＬ３／ＡＮＧＰＴＬ４およびそれらの関連する経路のさらなる研究を正当化することを示す。例えば、ＡＮＧＰＴＬ３／ＡＮＧＰＴＬ４は、以下の経路において役割を果たすことに関わっている：Ａｋｔ、コレステロール、脂肪酸、ＨＤＬ－コレステロール、ＨＮＦ１Ａ、ＩＴＧＡ５、ＩＴＧＡ５、ＩＴＧＡＶ、ＩＴＧ８３、Ｌ－トリヨードチロニン（ｔｒｉｌｏｄｏｔｈｙｎｏｎｉｎｅ）、ＬＩＰＧ、ＬＰＬ、Ｍａｐｋ、Ｎｒｔｈ、ＮＲ１Ｈ３、ＰＰＡＲＤ、ＰＴＫ２、ＲＸＲＡ、トリアシルグリセロール（ｔｒｉａｃｙｌｇｌｅｒｏｌ）、および９－シス－レチノイン酸。

実施例１４：肝臓癌（ＨＥＰＧ２）細胞上のＰＣＲアポトーシスアレイ

アポトーシスアレイは、上記のように、１６時間および４８時間、１００μＭ　Ｑ１０で処理された試料について実行された。しかし、４８時間のアレイは、ＳＹＢＲの代わりに蛍光団としてＦＡＭを選んで実行された。ＦＡＭとＳＹＢＲの両方は同じ波長で蛍光を発する。

【０４４９】

Ｑ１０処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表２８に要約される。これらの結果は、ＣＡＳＰ９がＱ１０処理の１６時間後に対照の約６１倍上方調節されたのに対し、ＢＡＧ１およびＴＮＦＲＳＦ１Ａは、処理の１６時間後に対照よりもそれぞれ約６倍および４倍下方調節されたことを示す。処理後４８時間では、ＣＡＳＰ９、ＢＡＧ１、およびＴＮＦＲＳＦ１Ａは、対照よりもそれぞれ約５５倍、１倍、および１倍上方調節された。

【表２８】

表２８　ＨｅｐＧ２細胞が１００μＭ　Ｑ１０で処理されたときにアポトーシスアレイにおいて調節される遺伝子のリスト

遺伝子	遺伝子の名称	遺伝子の機能
ＢＡＧ１	ＢＣＬ２関連アタノジーン	アポトーシスに関与
ＣＡＳＰ９	カスパーゼ９、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	シトクロムｃの放出を通したアポトーシス
ＴＮＦＲＳＦ１Ａ	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー１Ａ	抗アポトーシス、多くの細胞死因子を結合、ＩＣＡＭ１を調節

【０４５０】

実施例１５：代謝性障害を処置するためのエピシフターの能力の評価

選択されたエピシフター、例えば、ＣｏＱ１０が代謝性障害、例えば、糖尿病を処置することが可能か否かを決定するために、インスリン刺激されたグルコースの取り込みの増加をインビトロで監視する細胞ベースのアッセイが利用される。特に、分化したマウス脂肪細胞が、放射活性グルコースのシンチレーション計数によって検出されるのと同様に（例えば、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　１４５０　Ｍｉｃｒｏｂｅｔａ　ＪＥＴ　ｒｅａｄｅｒを使用する）、インスリン刺激の際にグルコース取り込みが増加する能力を有する薬剤を同定するために使用される。これらのアッセイは以下のように実施される。

【０４５１】

材料および方法

Ｐｒｅｅｓ培地

「Ｐｒｅｅｓ」培地とも呼ばれるＰｒｅｅｓ　Ｍｅｄｉａ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ培地は以

下のように調製される。ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）は、Ｌ－グルタミン、ペニシリン－Ｇおよびストレプトマイシン（ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ）、および熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（６５℃で３０分間熱不活化）で補充される。　血清は細胞の成長、接着および分化に影響を与え得るので、任意の新たなロットの血清は使用前に最初に試験された。指示色素の赤色／オレンジ色によって示されるように、ｐＨが適正な範囲内（約７）になるまで、培地はインキュベーター（５％　ＣＯ２）中で平衡化された。培地がピンク色になる場合（高ｐＨを示す）、基礎条件が細胞に影響を与え、分化培地－１（ＤＭ１）および分化培地－２（ＤＭ２）において使用されるインスリンを変性させる可能性があるので、本発明者らは培地を廃棄した。

【０４５２】

分化培地

分化培地１（ＤＭ１）は、１０％　ＦＢＳ、Ｌ－グルタミン、ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ、ＩＢＭＸ（３７５μＭ）、インスリン（１２０ｎＭ）、およびデキサメタゾン（１８８ｎＭ）を補充することによって調製された。分化培地２（ＤＭ２）は、１０％　ＦＢＳを有するＤＭＥＭ、Ｌ－グルタミン、ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ、およびインスリン（１２０ｎＭ）を補充することによって調製された。

【０４５３】

ゼラチン処理プレートの調製

細胞培養プレートは以下のようにゼラチン処理される。ゼラチン（蒸留水中１％　ｗ／ｖ）は、オートクレーブされ、室温で保存された。各細胞培養ウェルの底はゼラチン溶液で均一に覆われ、泡が形成されていないことを確実にした。この溶液は除去され、ゼラチンの薄膜を残した。これらのプレートは、組織培養フードの下に放置して乾燥させる。次に、プレートはＰＢＳで洗浄され、その後、０．５％グルタル酸ジアルデヒド溶液（蒸留水中グルタルアルデヒド）が細胞培養ウェルに加えられた。１０分後、ウェルはｐｅｎ／ｓｔｒｅｐを含むＤＭＥＭで２回洗浄される。各洗浄工程は、約５分間続くべきである。

【０４５４】

細胞培養

３Ｔ３－Ｌ１プレ脂肪細胞は、およそ２～３日毎に、または約６０％のコンフルエンスに到達した際に分けられる。過度のコンフルエンスは、これらの細胞が脂肪細胞に分化する能力に影響を与える可能性がある。

【０４５５】

他の試薬

Ｄ－（＋）グルコース（「コールド」グルコース、放射性標識されていない）が、１０ｍＭの最終濃度までＤＰＢＳミックスに加えられた。

【０４５６】

溶解緩衝液、塩基の混合物（例えば、０．５Ｎ最終濃度の水酸化ナトリウム）、および洗剤（例えば、０．１％　ｗ／ｖの最終濃度に希釈されたドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ））が各回新鮮に調製された（使用の１～２時間以内）。使用前に、溶解緩衝液は、緩衝剤の沈殿を回避するために、約３０分間の時間、室温を超える温度まであたためられた。

【０４５７】

グルコース取り込みの決定

プレ脂肪細胞３Ｔ３－Ｌ１細胞は、約５０００細胞／ウェルの密度でプレートされる（黒色ＮＵＮＣ９６ウェルプレート中）。これらの細胞は、２つの別々の工程で脂肪細胞に分化される。最初に、細胞は、分化培地－１（ＤＭ１）中で、２～３日間の間培養される（脂肪細胞分化の１日目）。ＤＭ１は、増殖を妨害し、脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘導する。次に、細胞は分化培地－２（ＤＭ２）中で３～４日間培養され、その後、培養培地は新鮮なＤＭ２によって置き換えられる。グルコース取り込みアッセイは、分化の９～１５日目に実施される。

【０４５８】

実験の２日前に（分化の７～１３日目）、ＤＭ２は除去され、新鮮なＰｒｅｅｓ培地で置き換えられる。候補化合物はこのときに加えられ、約４８時間のインキュベーション時間を与える。実験の当日に、細胞（この時点で分化の９～１５日目）は、ＤＰＢＳ、硫酸マグネシウム（０．８ｍＭ）、およびＨｅｐｅｓ（１０ｍＭ）、ｐＨ約７中で３時間血清飢餓状態とされる。このインキュベーション時間後、インスリン（１０ｎＭ）を含有する新鮮なＤＰＢＳが脂肪細胞に加えられる。いかなるインスリンも有さない新鮮なＤＰＢＳが細胞上に配置され、これは陰性対照として働く。３７℃で２５分間のインキュベーション後、放射性グルコース（１４Ｃで標識、最終濃度０．０４ｍＭ、各ウェル中約０．２６μＣｉ１４Ｃ－グルコース）が室温で１５分間の間、培地に加えられる。次に、培地が除去され、細胞は徹底的に洗浄され、そして溶解される。溶解に際して、細胞は、ウェルの底から脱離して、小さな、曇った固まりを形成する。１０％氷酢酸が各ウェルに加えられ、溶解反応を中和する。次に、シンチレーション液がウェルに加えられ、グルコースの取り込みが、ＭｉｃｒｏＢｅｔａプレートリーダーを使用して、各ウェル中の放射能の量を測定することによって決定される。

【０４５９】

前述の実験プロトコルを使用して、エピシフターが、インビトロで細胞中のインスリン刺激されたグルコースの取り込みを増強、増加、または増大するときに、エピシフターは、代謝性障害、例えば、糖尿病を処置することが可能であると同定される。

【０４６０】

実施例１６：代謝性障害と関連するＭＩＭの同定

潜在的なＭＩＭとしての候補分子（例えば、環境影響因子）を評価するために、選択された候補ＭＩＭが、疾患（癌）細胞系統と正常対照細胞系統の両方を含む細胞系統のパネルに外因的に加えられ、パネル中の各細胞系統の細胞微少環境プロフィールに対して誘導された変化が評価される。例えば、ｍＲＮＡおよびタンパク質のレベルを含む、細胞形態学、生理学、および／または細胞組成に対する変化が評価され、正常細胞との比較と同様に、疾患細胞について比較される。

【０４６１】

細胞形態学／生理学の変化は、候補ＭＩＭに対する細胞の感受性およびアポトーシス性応答を調べることによって評価される。これらの実験は、実施例３に詳細に記載されるように実行される。手短に述べると、少なくとも１つの対照細胞系統および少なくとも１つの癌細胞系統からなる細胞系統のパネルが、種々の濃度の候補ＭＩＭで処理される。潜在的なＭＩＭに対する細胞系統の感受性は、様々な時間、および適用される濃度の範囲にわたって細胞生存を監視することによって評価される。潜在的ＭＩＭに対する細胞系統のアポトーシス性応答は、例えば、フローサイトメトリー方法論と組み合わせたネキシン試薬を使用することによって評価される。ネキシン試薬は、２種の染料、７ＡＡＤおよびアネキシン－Ｖ－ＰＥの組み合わせを含み、初期および後期のアポトーシスにおける細胞集団の定量化を可能にする。例えば、Ａｐｏｓｔｒａｎｄ（商標）ＥＬＩＳＡ方法論を使用する、一本鎖ＤＮＡを測定するさらなるアポトーシスアッセイが使用されてもよい。疾患および対照の細胞系統の感受性およびアポトーシス性応答が評価および比較される。正常細胞と比較されるような疾患細胞において、示差的な細胞傷害性を表示し、および／またはアポトーシス性応答を示差的に誘導する分子がＭＩＭとして同定される。

【０４６２】

候補ＭＩＭを用いる処置後の細胞の組成の変化が評価される。ｍＲＮＡレベルでの遺伝子発現の変化がリアルタイムＰＣＲアレイ方法論を使用して分析される。これらの実験は、実施例６および９－１３において詳細に記載されるように実行される。手短に述べると、候補ＭＩＭは、例えば、疾患細胞系統および正常対照細胞系統を含む１種以上の細胞系統に外因的に加えられ、ｍＲＮＡは処置後の様々な時点で細胞から抽出される。特定の経路に関与する遺伝子のｍＲＮＡのレベルは、例えば、アポトーシス、酸化ストレスおよび自己酸化防御、血管形成、熱ショック、または糖尿病に特異的なアレイを含む、標的とされる経路アレイを使用することによって評価される。２倍レベル以上で遺伝子のｍＲＮＡ

転写が変化される遺伝子が同定および評価される。細胞中でｍＲＮＡレベルの変化を誘導し、および／または正常細胞と比較して疾患細胞において１種以上のｍＲＮＡのレベルの示差的な変化を誘導する分子はＭＩＭとして同定される。

【０４６３】

相補実験において、タンパク質レベルでの遺伝子発現の変化は、抗体マイクロアレイ方法論、二次元ゲル電気泳動、続いて質量分析による特徴付けを使用するタンパク質の同定を使用することによって、およびウェスタンブロット分析によって分析される。これらの実験は、それぞれ、実施例７、４、および８において詳細に記載されるように実行される。手短に述べると、候補ＭＩＭは、例えば、疾患細胞系統および正常対照細胞系統を含む１種以上の細胞系統に外因的に加えられ、可溶性タンパク質が、処置後の様々な時点、例えば、６時間または２４時間で細胞から抽出される。タンパク質レベルで誘導された候補ＭＩＭによる変化が、広い範囲のタンパク質型および潜在的な経路マーカーをサンプリングしている７００種を超えるタンパク質に対する抗体を含む抗体マイクロアレイを使用することによって評価される。さらなる相補プロテオーム分析は、質量分析方法論と連動した二次元（２－Ｄ）ゲル電気泳動を利用することによって実行できる。候補ＭＩＭは、例えば、疾患細胞および正常対照細胞系統を含む１種以上の細胞系統に外因的に加えられ、細胞ペレットは溶解され、二次元ゲル電気泳動に供される。ゲルは、未処置試料である対照と比べて処置試料でのタンパク質レベルの変化を同定するために分析される。ゲルは、レベルの増加、レベルの減少、または翻訳後修飾に起因する、処置の時間経過にわたるスポット変化の同定について分析される。統計学的に有意な変化を示すスポットは、トリプシン消化および質量分析による特徴付けによるタンパク質同定のために、切り出され、提出される。特徴付けされたペプチドは、例えば、ＭａｓｃｏｔおよびＭＳＲＡＴソフトウェア分析を用いて、タンパク質データベースに対して検索され、タンパク質を同定する。前述の２－Ｄゲル分析および抗体マイクロアレイ実験に加えて、候補ＭＩＭによって誘導される特定のタンパク質のレベルに対する潜在的な変化が、ウェスタンブロット分析によって評価されてもよい。すべてのプロテオーム実験において、種々の細胞系統におけるレベルの増加または減少を伴うタンパク質が同定および評価される。細胞中でタンパク質レベルの変化を誘導し、および／または正常細胞と比較して疾患細胞において１種以上のタンパク質のレベルの示差的な変化を誘導する分子がＭＩＭとして同定される。

【０４６４】

前述の実験から候補ＭＩＭを用いる処置によって調節されることが見い出された遺伝子は、細胞および生化学的経路分析に供され、それによって、例えば、アポトーシス、癌生物学、および細胞増殖、解糖および代謝、分子輸送、ならびに細胞シグナル伝達を含む種々の細胞経路に分類できる。

【０４６５】

候補ＭＩＭの細胞への侵入を確認するため、候補ＭＩＭが細胞内に局在化されるようになるか否かを決定するため、ならびに細胞中に存在する候補ＭＩＭのレベルおよび型を決定するための実験が実行される。これらの実験は、例えば、実施例５に詳細に記載されているように実行される。例えば、ミトコンドリアに存在する候補ＭＩＭのレベルおよび型を決定するために、候補ＭＩＭで処置された細胞からのミトコンドリア富化調製物が調製および分析される。ミトコンドリアに存在する候補ＭＩＭのレベルは、それによって、外因性候補ＭＩＭの添加に伴って、時間および用量依存的な様式で増加することが確認できる。加えて、ミトコンドリア富化試料からのタンパク質のレベルの変化は、全体の細胞タンパク質試料のために上記に記載されたように、二次元ゲル電気泳動および質量分析の特徴付けによるタンパク質同定を使用することによって分析される。細胞に侵入することが見い出され、例えば、ミトコンドリアにおいて増加レベルで存在することが見い出された候補ＭＩＭは、ＭＩＭとして同定される。試験された時間経過にわたる細胞中の、または例えば、具体的には、ミトコンドリア中の候補ＭＩＭのレベルは、例えば、特定のタンパク質のｍＲＮＡおよびタンパク質レベルの調節によって証明されるように、他に観察される細胞の変化と相関できる。

【０４６６】
細胞組成の変化を誘導すること、例えば、ｍＲＮＡまたはタンパク質レベルでの遺伝子発現の変化を誘導することが観察された候補ＭＩＭは、ＭＩＭとして同定される。正常状態と比較して疾患状態（例えば、糖尿病または肥満）において、細胞の形態学、生理学、または細胞組成の示差的な変化（例えば、ｍＲＮＡまたはタンパク質レベルにおける遺伝子発現の示差的な変化）を誘導することが観察された候補ＭＩＭは、ＭＩＭとして、特に多次元性質を有するとして同定される。細胞に入ることが可能であることが見い出された候補ＭＩＭは、候補ＭＩＭがそれによって治療効果に加えてキャリア効果を提示するので、ＭＩＭとして、特に、多次元性質を有するとして同定される。

【０４６７】
実施例１７：代謝性障害と関連するエピシフターとしてのＣｏＱ１０の同定
対照細胞系統（ケラチン形成細胞およびメラニン形成細胞の初代培養）およびいくつかの皮膚癌細胞系統（非転移性皮膚黒色腫であるＳＫ－ＭＥＬ－２８；転移性皮膚黒色腫であるＳＫ－ＭＥＬ－２；または扁平上皮細胞癌であるＳＣＣ；膵臓癌細胞系統であるＰａＣａ２；または肝臓癌細胞系統であるＨＥＰ－Ｇ２）からなる皮膚細胞系統のパネルが様々なレベルのコエンザイムＱ１０で処置された。癌細胞系統は、対照細胞系統と比較したときに、用量依存的応答の変化を示し、癌細胞においてのみ、アポトーシスおよび細胞死の誘導を伴った。詳細な例示的な実験は、例えば、本明細書の実施例３に提示される。

【０４６８】
アッセイは、ＣｏＱ１０を用いる処置後に上記に同定される細胞のｍＲＮＡおよびタンパク質レベルでの組成の変化を評価するために利用される。ｍＲＮＡ発現の変化は、アポトーシス、酸化ストレスおよび抗酸化剤、血管形成、および糖尿病の各々について特異的であるリアルタイムＰＣＲマイクロアレイを使用して分析された。タンパク質発現の変化は、抗体マイクロアレイ分析およびウェスタンブロット分析を使用して分析された。これらのアッセイからの結果は、ｍＲＮＡとタンパク質の両方のレベルで、コエンザイムＱ１０の添加に起因して、細胞系統中で、遺伝子発現の有意な変化が起こっていたことを実証した。細胞の代謝プロセスに付随するか、またはそれに関与することが知られている多数の遺伝子が、ＣｏＱ１０を用いる処置の結果として、調節されるものとして観察された。例えば、核受容体タンパク質ＨＮＦ４Ａの発現は、Ｑ１０処置後に細胞中で上方調節されていることが見い出された。トランスアルドラーゼ１（ＴＡＬ）の発現もまた、Ｑ１０で処置された細胞中で調節された。ＴＡＬはＮＡＤＰＨおよび反応性酸素中間体のレベルのバランスをとり、それによって、ミトコンドリアの膜電位を調節し、これは、ＡＴＰ合成および細胞生存の決定的なチェックポイントである。代謝性障害と特に関連するものの中で、例えば、糖尿病と関連することが知られている多数の遺伝子がＱ１０によって調節されるとして同定された。詳細な例示的な実験が、例えば、本明細書の実施例４、６、７、８、および９に提示されている。

【０４６９】
Ｑ１０は、エネルギー産生のためにミトコンドリアの中での酸化的（ｅｘｉｄａｔｉｖｅ）リン酸化プロセスのための必須のコファクターである。ミトコンドリア中に存在するコエンザイムＣｏＱ１０のレベルは、ＣｏＱ１０の型と同様に、ＣｏＱ１０で処置された細胞からミトコンドリアが富化された調製物を分析することによって決定される。ミトコンドリア中に存在するコエンザイムＱ１０のレベルは、外因性Ｑ１０の添加に伴って、時間および用量依存的な様式で増加することが確認された。時間経過は、代謝およびアポトーシス経路と関連する特定のタンパク質についてｍＲＮＡおよびタンパク質レベルの調節において観察されるような広範な種々の細胞の変化と相関した。詳細な例示的な実験は、例えば、本明細書の実施例５に提示される。

【０４７０】
本明細書に記載された結果は、エピシフターとして内因性分子ＣｏＱ１０を同定した。特に、結果は、細胞中で、代謝状態のシフト、および部分的にミトコンドリア機能の回復を誘導するとしてＣｏＱ１０を同定した。これらの結論は、本明細書に記載されているデ

ータの以下の解釈、および関連分野における現在の知見に基づいている。

【０４７１】

Ｑ１０は、合成され、ミトコンドリア内膜に能動輸送され、そこで富化され、およびそこで利用されることが知られている。Ｑ１０はまた、エネルギー産生のためのミトコンドリアにおける酸化的リン酸化のプロセスのための必須のコファクターであることも知られている。しかし、多くの癌細胞は、多くの正常細胞のようにミトコンドリアにおいてピルビン酸の酸化によるのではなく、解糖とその後の細胞質ゾル中での乳酸発酵によって、優勢にエネルギーを産生する。酸化的リン酸化は、電子伝達系およびシトクロムｃを含む。アポトーシスはミトコンドリアの破壊を含み、アポトーシス促進性因子によるミトコンドリア内膜の浸透能（ｐｅｒｍｉａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）を伴う。様々な代謝エネルギー合成経路を利用することによって、癌細胞は、細胞中の異常に対する通常のアポトーシス性応答を軽減することが可能である。理論によって束縛されることを望まないが、出願人は、酸化的リン酸化経路のタンパク質を上方調節すること、したがって、発癌の欠陥を認識し、アポトーシスの引き金を引く状態に戻るようにミトコンドリアの機能にスイッチを入れることによってＱ１０が機能していることを提案する。したがって、Ｑ１０は、細胞の代謝状態をシフトすることによってエピシフターとして作用している。

【０４７２】

実施例１８：代謝性障害と関連するエピシフターの同定

対照細胞系統（例えば、ケラチン形成細胞およびメラニン形成細胞の初代培養）および癌細胞系統（例えば、非転移性皮膚黒色腫であるＳＫ－ＭＥＬ－２８；転移性皮膚黒色腫であるＳＫ－ＭＥＬ－２；または扁平上皮細胞癌であるＳＣＣ；膵臓癌細胞系統であるＰａＣａ２；または肝臓癌細胞系統であるＨＥＰ－Ｇ２）からなる皮膚細胞系統のパネルが様々なレベルの候補エピシフターで処置された。細胞形態学／生理学の変化は、候補エピシフターに対する細胞の感受性およびアポトーシス性応答を調べることによって評価される。これらの実験は、実施例３に詳細に記載されるように実行される。手短に述べると、候補エピシフターに対する細胞系統の感受性は、様々な時間、および適用される濃度の範囲にわたって細胞生存を監視することによって評価される。候補エピシフターに対する細胞系統のアポトーシス性応答は、例えば、フローサイトメトリー方法論と組み合わせたネキシン試薬を使用することによって評価される。ネキシン試薬は、２種の染料、７ＡＡＤおよびアネキシン－Ｖ－ＰＥの組み合わせを含み、初期および後期のアポトーシスにおける細胞集団の定量化を可能にする。例えば、Ａｐｏｓｔｒａｎｄ（商標）ＥＬＩＳＡ方法論を使用する、一本鎖ＤＮＡを測定するさらなるアポトーシスアッセイが使用されてもよい。疾患および対照の細胞系統の感受性およびアポトーシス性応答が評価および比較される。候補エピシフターは、正常または対照細胞と比較された場合に、癌細胞において優勢にまたは選択的に細胞増殖を阻害するそれらの能力に基づいて評価される。候補エピシフターはさらに、正常または対照細胞と比較された場合に、癌細胞において優勢にまたは選択的にアポトーシスを誘導するそれらの能力に基づいて評価される。

【０４７３】

候補エピシフターを用いる処置後に上記に同定された細胞のｍＲＮＡおよびタンパク質レベルでの組成物の変化を評価するためのアッセイが利用される。ｍＲＮＡレベルの変化はリアルタイムＰＣＲマイクロアレイを使用して分析される。これらの実験は、実施例６および９－１３において詳細に記載されるように実行される。手短に述べると、ｍＲＮＡは、処置後の様々な時点で細胞から抽出される。特定の経路に関与する遺伝子のｍＲＮＡのレベルは、アポトーシス、酸化ストレスおよび自己酸化防御、血管形成、熱ショック、または糖尿病に特異的なアレイを含む、標的とされる経路アレイを使用することによって評価される。２倍レベル以上で遺伝子のｍＲＮＡ転写が変化される遺伝子が同定および評価される。

【０４７４】

タンパク質発現の変化は、抗体マイクロアレイ分析、質量分析特徴付けと連動した二次元ゲル電気泳動分析、およびウェスタンブロット分析を使用して分析される。これらの実

験は、それぞれ、実施例７、４、および８において詳細に記載されるように実行される。手短に述べると、可溶性タンパク質は、候補エピシフターを用いる処置後の様々な時間、例えば、６時間または２４時間で細胞から抽出される。候補エピシフターによってタンパク質レベルまで誘導された変化は、広い範囲のタンパク質型および潜在的な経路マーカーをサンプリングしている７００種を超えるタンパク質に対する抗体を含む抗体マイクロアレイを使用することによって評価される。さらなる相補プロテオーム分析は、質量分析方法論と連動した二次元（２－Ｄ）ゲル電気泳動を利用することによって実行できる。候補エピシフターは、細胞系統に外因的に加えられ、細胞ペレットは溶解され、２－Ｄゲル電気泳動に供される。ゲルは、未処置試料である対照と比べて処置試料でのタンパク質レベルの変化を同定するために分析される。ゲルは、レベルの増加、レベルの減少、または翻訳後修飾に起因する、処置の時間経過にわたるスポット変化の同定について分析される。統計学的に有意な変化を示すスポットは、トリプシン消化および質量分析による特徴付けによるタンパク質同定のために、切り出され、提出される。特徴付けされたペプチドは、例えば、ＭａｓｃｏｔおよびＭＳＲＡＴソフトウェア分析を用いて、タンパク質データベースに対して検索され、タンパク質を同定する。前述の２－Ｄゲル分析および抗体マイクロアレイ実験に加えて、候補ＭＩＭによって誘導される特定のタンパク質のレベルに対する潜在的な変化が、ウェスタンブロット分析によって評価されてもよい。すべてのプロテオーム実験において、種々の細胞系統におけるレベルの増加または減少を伴うタンパク質が同定および評価される。

【０４７５】

候補エピシフターは、候補エピシフターの添加に起因して、細胞系統中で、ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質レベルで遺伝子発現に誘導される変化に基づいて評価される。特に、候補エピシフターは、細胞代謝プロセスに付随するかまたはそれに関与することが知られている遺伝子を調節するそれらの能力に基づいて評価される。代謝性障害と特に関連するものの中で、候補エピシフターは、例えば、糖尿病または肥満と関連することが知られている遺伝子を調節するそれらの能力に基づいて評価される。

【０４７６】

細胞または特定の細胞位置に存在する候補エピシフターのレベル、ならびに候補エピシフターの型は、当業者に公知である日常的な方法を使用して決定される。例えば、経時的かつ一定の範囲の用量にわたるミトコンドリアにおける候補エピシフターのレベルは、候補エピシフターを用いて処置された細胞からのミトコンドリア富化調製物を分析することによって決定される。時間経過にわたってのミトコンドリアにおける候補エピシフターのレベルは、観察された他の細胞の変化、例えば、代謝経路およびアポトーシス経路に関連する特定のタンパク質のｍＲＮＡおよびタンパク質のレベルの調節と比較および相関できる。

【０４７７】

前述の実験から得られた結果に基づいて細胞の代謝状態のシフトを誘導することが観察された候補エピシフターは、エピシフターとして同定される。例えば、細胞中でインスリン刺激されたグルコースの取り込みを増強、増加、または増大する候補エピシフターはエピシフターとして同定される。

【０４７８】

実施例１９：エピシフターとしてのビタミンＤ３の同定

ビタミンＤ３、すなわち、１α、２５－ジヒドロキシビタミンＤ３（カルシトリオールとしてもまた知られる）は、ビタミンＤから２段階酵素プロセスによって合成されるビタミンＤ代謝物である。ビタミンＤ３はその遍在性核ビタミンＤ受容体（ＶＤＲ）と相互作用し、カルシウムおよびリン酸の恒常性ならびに細胞分裂および分化に関与する遺伝子の広範なスペクトルの転写を調節する。ビタミンＤ３は、扁平上皮細胞癌、前立腺腺癌、卵巣癌、乳癌、および肺癌を含む多数のモデル系において抗癌効果を有することが報告されている（Ｄｅｅｂ ｅｔ ａｌ．２００７ Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｃａｎｃｅｒ ７：６８４－７００に概説されている）。

【０４７９】
ビタミンＤ３の抗癌効果は、細胞周期のＧ１期での増殖停止、アポトーシス、腫瘍細胞分化、増殖因子媒介性細胞生存シグナルの破壊、ならびに血管形成および細胞接着の阻害を含む、複数のメカニズムを含むことが報告されている（Ｄｅｅｂ　ｅｔ　ａｌ．２００７　Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃａｎｃｅｒ　７：６８４－７００に概説されている）。例えば、特にアポトーシスに関して、ビタミンＤ３は、アポトーシスの重要な媒介因子を調節すること、例えば、抗アポトーシス性の、生存促進性タンパク質ＢＣＬ２およびＢＣＬ－ＸＬの発現を抑制すること、またはアポトーシス促進性タンパク質（例えば、ＢＡＸ、ＢＡＫ、およびＢＡＤ）の発現を誘導することによってアポトーシスを誘導することが報告されてきた（Ｄｅｅｂ　ｅｔ　ａｌ．２００７）。さらなる例において、特に血管形成に関連して、ビタミンＤ３は、いくつかの腫瘍由来内皮細胞の増殖を阻害すること、および腫瘍において血管形成を誘導する血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）の発現を阻害することが報告されてきた（Ｍａｓｕｄａ　ａｎｄ　Ｊｏｎｅｓ，２００６　Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ．５（４）：７９７－８０７０に概説されている）。別の例において、特に細胞周期停止に関して、ビタミンＤ３は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターｐ２１ＷＡＦＩ／ＣＩＰＩの遺伝子転写を誘導すること、ならびにサイクリン依存性キナーゼインヒビターｐ２７ＫＩＰＩタンパク質の合成および／または安定化を誘導することが報告されており、これらの両方とも、Ｇ１停止の誘導のために決定的である（Ｄｅｅｂ　ｅｔ　ａｌ．２００７）。

【０４８０】
上述の観察に基づいて、すなわち、細胞の代謝状態をシフトされるその能力により、ビタミンＤ３はエピシフターとして同定される。ビタミンＤ３は、細胞中でアポトーシスを誘導するその能力により、特に、正常細胞と比較した場合に、疾患（癌）細胞において示差的に細胞増殖を阻害し、およびアポトーシス性応答を誘導するその能力に基づいて、エピシフターである（例えば、正常細胞と比較した場合に、癌細胞においてアポトーシスに関与する、ＢＣＬ－２、ＢＣＬ－ＸＬ、およびＢＡＸなどのタンパク質の発現を示差的に調節する）。

【０４８１】
実施例２０：重要なタンパク質の要約
要約として、前述の実施例に記載された実験の結果に基づいて、Ｑ１０によって調節される重要なタンパク質は以下の表に要約される。

【表２９】
表２９　Ｑ１０によって調節される鍵となるタンパク質

経路	実施例
転写因子	ＨＮＦ４アルファ
アポトーシス性応答	Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｂｃｌ－ｘＳ、ＢＮＩＰ－２、Ｂｃｌ－２、Ｂｉｒｃ６、Ｂｃｌ－２－Ｌ１１（Ｂｉｍ）、ＸＩＡＰ、ＢＲＡＦ、Ｂａｘ、ｃ－Ｊｕｎ、Ｂｍｆ、ＰＵＭＡ、ｃＭｙｃ
ペントースリン酸経路	トランスアルドラーゼ１
生合成経路	ＣＯＱ１、ＣＯＱ３、ＣＯＱ６、プレニルトランスフェラーゼ、４－ヒドロキシベンゾエート
酸化ストレス（酸化促進剤）	好中球サイトゾル因子２、１酸化窒素シンターゼ２Ａ、スーパーオキシドディスムターゼ２（ミトコンドリア）
膜の変化	ＶＤＡＣ、Ｂａｘチャネル、ＡＮＴ、
酸化的リン酸化代謝	シトクロムｃ、複合体Ｉ、複合体ＩＩ、複合体ＩＩＩ、複合体ＩＶ、

【０４８２】
実施例２１：コエンザイムＱ１０を用いて処置された細胞のウェスタン分析
過去５０年にわたって、悪性形質転換の根底にある原因としての特定のプロセスに影響を与える内因性／外因性因子に関わりがある膨大な量の情報が生じてきた。臨床的および基礎的文献は、ＤＮＡ構造および機能の変化が、癌を遺伝病として規定する、癌の開始お

よび進行において顕著な役割を果たすという証拠を提供している（Ｗｏｏｓｔｅｒ，２０１０；Ｈａｉｍａｎ，２０１０）。１９２０年代初頭、発癌の病因論の根本的な変化を特徴付けることに従事していたＯｔｔｏ　Ｗａｒｂｕｒｇおよび他の研究者は、２つの主要な観察（ａ）Ｗａｒｂｕｒｇ効果としてもまた知られる、酸素の存在下でのエネルギー産生のためのＡＴＰの生成においてグルコースを輸送および利用する細胞の能力、ならびに（ｂ）ミトコンドリアＡＴＰの産生の減少に導く電子伝達の変化を含む、ミトコンドリアの構造および機能の変動を記述した。過去数年間は、癌の病因論、すなわち、癌を転移性疾患として見ることにおける細胞バイオエネルギーの中心的な役割を調べることの復活であった。

【０４８３】

歴史的には、遺伝子の変異が遺伝子発現の変化の原因であると考えられてきたけれども、発癌を支持する遺伝子発現に影響を与える際に決定的な役割を果たす後成的プロセスを支持している文献が蓄積しつつある。これは、多くの遺伝子の突然変異率が低く、癌細胞において見い出される多数の（スペクトルの）変異を説明できないという観察によって証明されている。後成的変化は、ヒストンテールのメチル化および修飾によって調節され、両方の変化は、ヒストンアセチル化のために、コファクター、例えば、アセチルＣｏＡ要求の利用性を必要とするので、細胞のエネルギー（栄養）状態に固有に連関している（参照）。アセチルＣｏＡの生合成は、解糖とクレブス回路に依存し、細胞内エネルギー状態を遺伝子の発現および活性の調節に直接連関させる。

【０４８４】

正常細胞において、ミトコンドリアの酸化的リン酸化は、十分なＡＴＰを生成して、正常な生理学的活性および細胞生存を維持するためのエネルギー要求に合致している。ミトコンドリアのエネルギー産生の結果は、反応性酸素種（ＲＯＳ）の生成であり、その異常な産生はミトコンドリアの損傷に導く（参照）。発癌の病因論に関わりがある現象である、ミトコンドリアによる長期ＲＯＳ生成は、遺伝子の変異の累積的蓄積をもたらすことが十分に確立されている。癌細胞はＲＯＳ生成を最小化するようにミトコンドリア呼吸を減少し、エネルギー産生を維持するために解糖に切り替わることが示唆されてきた。したがって、酸化的リン酸化から解糖へのエネルギー産生の進行的シフトは、生理学的機能を維持するためにエネルギー産生を維持するために細胞にとって必須であり、正常細胞の表現型から癌細胞の表現型への進行に付随し得る。ミトコンドリアの遺伝的構成における変化（変異）の蓄積と連携した細胞のエネルギー（生体エネルギー）プロフィールの進行性シフトは、細胞メタボロームを変化させる。解糖の推移に対するミトコンドリアのリン酸化の結果としての全細胞メタボロームプロフィールの変化は、異常な生体エネルギー誘導性メタボロームプロフィールに対応し、発癌を支持する根底にある原因である。非癌性正常ミトコンドリア酸化的リン酸化関連細胞生体エネルギーの状態に向かって細胞メタボロームシフトを誘発するために内因性分子を使用する標的化介入は、癌の処置における治療の評価項目を表す。

【０４８５】

エピ－メタボロームシフトを引き起こすＭＩＭとしてのコエンザイムＱ１０

本明細書に提示されるデータは、コエンザイムＱ１０を用いた正常および癌細胞の処置が、解糖－ミトコンドリア酸化ストレス連続体の中で重要な生化学的末端を調節するタンパク質の発現の変化に関与することを実証する。ウェスタンブロッティングおよび酸素消費によるタンパク質発現の評価を説明するデータの組み合わせは、正常細胞において、コエンザイムＱ１０の曝露後に、正常な解糖およびミトコンドリア速度の有意な変化がないことを実証する。したがって、正常細胞系統、例えば、ＨＤＦａ（正常ヒト成体線維芽細胞）、ＨＡＳＭＣ（正常ヒト大動脈平滑筋細胞）、ｎＦｉｂ（正常線維芽細胞）、およびＨｅＫａ（正常ヒトケラチン生成細胞）におけるタンパク質の発現の値およびミトコンドリア呼吸速度は、ベースライン生理学的状態を表すと見なすことができる。癌細胞系統、例えば、ＨｅｐＧ２（肝臓癌）、ＰａＣａ－２（膵臓癌）、ＭＣＦ７（乳癌）、ＳＫ－ＭＥＬ（黒色腫）、およびＳＣＣ－２５（扁平上皮細胞癌）におけるタンパク質の発現およ

びミトコンドリア呼吸速度の何らかの逸脱は、この場合は、癌における疾患の開始／進行に起因する変化を表す。実験的証拠は、癌細胞に対するコエンザイムＱ１０の曝露が、正常細胞を彷彿とさせる細胞の病態生理学的再組織化と関わりがあるという仮説に対するサポートを提供する。具体的には、本明細書に提供されるデータは、癌細胞中でのコエンザイムＱ１０曝露は、正常細胞において観察される細胞構造に対する、細胞構造の全体的な再組織化の誘導の原因である、解糖経路におけるシフトおよびミトコンドリアの酸化的リン酸化と関わりがあることを実証する。

【０４８６】

正常細胞において、解糖アウトプットの終点は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化（ＯＸＰＨＯＳ）、すなわち、クレブスサイクル（トリカルボン酸回路、ＴＣＡ、またはクエン酸回路としても知られる）に入るための解糖経路を経由したグルコースからピルビン酸の生成に連関しており、還元当量を生成して、ＡＴＰ産生のためにＯＸＰＨＯＳをサポートする。したがって、正常細胞において、解糖に関与する遺伝子産物の発現および機能的な方向付けは、ピルビン酸の十分な生成およびそれがクレブスサイクルに入ることに向けて準備される。癌細胞における解糖およびクレブスサイクルに関与する重要なタンパク質の発現および機能の異常調節は、ミトコンドリア機能の顕著な減少に伴う解糖の増強を生じる。ミトコンドリア呼吸鎖に選択的に影響を与える内因性分子であるコエンザイムＱ１０への癌細胞の曝露は、解糖およびクレブスサイクル経路のタンパク質の発現を変化させ（正常化し）、エネルギー産生（すなわち、ＡＴＰ生成）がミトコンドリアに回復されるように、生体エネルギーシフトを容易にする。

【０４８７】

実験手順

ウェスタンブロット実験１

実験のために使用された細胞はＨＤＦａ細胞およびＭＣＦ－７細胞であり、これらは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の２４時間後に収穫された。全細胞ペレットが１ｍＬのＣ７緩衝液中で一度に再懸濁され、ラベルされた１５ｍＬチューブに移された。次いで、試料は、低温室にて、氷上で、番号１４の設定で６回の超音波パルスを使用して超音波処理された。超音波処理後、試料は２５００ｇで短時間遠心分離し、試料は２ｍｌチューブに移された。５０ｍＬ試料チューブに残っている泡を使用して、各試料のｐＨが確認された（ｐＨは９．０であるはずである）。

【０４８８】

試料のアルキル化および還元は、１０μｌの１Ｍ　アクリルアミド、２５μｌのトリブチルホスフィン（ｔｒｉｂｕｔｙｌｐｈｏｓｈｅｎｅ）を加えること、および断続的に混合しながらの９０分間のインキュベーションによって、各試料について実施された。インキュベーション後、１０μｌの１Ｍ　ＤＴＴが加えられ、チューブは２０，０００ｇで２０℃にて１０分間遠心分離され、そして１０ｋカットオフを有するラベルしたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心フィルターユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅカタログ番号ＵＦＣ　８０１０２４）に上清が移された。試料は、２分間隔で、２５００ｇで１５分間遠心分離された。電気伝導度は、Ｃｈａｐｓ単独ならびに試料について、電気伝導度メーターを使用して測定された。試料の電気伝導度が高い場合、１ｍｌのｃｈａｐｓが緩衝液交換のために加えられ、体積が２５０μｌに下がるまで、２５００ｇで再度遠心分離された。電気伝導度が２００以下であったとき、試料は、上清の体積が１５０－１００μｌの間になるまで、５分間隔で２５００ｇで遠心分離された。試料上清はエッペンドルフチューブに移され、ＢＳＡを標準として使用してＢｒａｄｆｏｒｄアッセイが実施された。

【０４８９】

試料は上記のような標準のプロトコルに従って処置され、各試料中のタンパク質の量はＢｒａｄｆｏｒｄアッセイによって決定された。１０μｇタンパク質に等価な試料体積が、以下に示されるように、Ｌａｍｅｌｌｉローディング染料（ＬＤＳ）およびＭｉｌｌｉＱ　水を用いて調製され、４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｎｏｖｅｘ　ＮｕＰＡＧＥゲ

ル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，カタログ番号ＮＰ０３２３Ｂｏｘ）上で泳動された。

【０４９０】

ゲルは、１×ＭＯＰＳ緩衝液を使用し、ＮＯＶＥＸ　Ｘｃｅｌｌ　Ｓｕｒｅｌｏｃｋシステムを使用して、２００Ｖで５０分間泳動された。次いで、ゲルは、ＮＯＶＥＸ　Ｘｃｅｌｌ　Ｓｕｒｅｌｏｃｋ湿式転写プロトコルを使用して、３０Ｖで１時間転写された。ブロットは、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＳｉｍｐｌｙ　Ｂｌｕｅ　Ｓａｆｅｓｔａｉｎ（ＬＣ６０６５）で染色された。

【０４９１】

ＨＤＦａおよびＭＣＦ－７試料におけるＩＤＨ１およびＡＴＰクエン酸リアーゼレベル

転写後、各ブロットは、２枚のＷｈａｔｍａｎ濾紙の間に配置され、１５－２０分間乾燥された。乾燥後、ブロットは、日付、試料の型、およびブロット１かブロット２のいずれかをＨＢ鉛筆でラベルされた。分子量マーカーは、鉛筆で輪郭が描かれ、１本線は青色であり、２本線は着色マーカーであった。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で１時間室温でブロッキングされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄された。ブロット１は５％　ＢＳＡを有するＴＢＳＴ中のＩＤＨ１に対する一次抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ番号３９９７）（１：１０００希釈）でプローブされ、ブロット２は、振盪しながら４℃で一晩のインキュベーションによって、１：１０００希釈の５％　ＢＳＡ中のＡＴＰクエン酸リアーゼについてのウサギポリクローナル抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ番号４３３２）を用いた。一次抗体との一晩のインキュベーション後、ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とともにインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０４９２】

ＨＤＦａおよびＭＣＦ－７試料におけるアクチンレベル

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。２つのブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。次いで、ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして１：５０００希釈の５％　ＢＳＡ中のアクチンに対する抗体（Ｓｉｇｍａ　カタログ番号Ａ５３１６、クローンＡＣ－７４）で、振盪しながら、室温で１時間プローブされた。アクチンに対する一次抗体との１時間のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗マウス；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０４９３】

ウェスタンブロット実験２

この実験において使用された細胞は、ＳＫＭＥＬ２８、ＳＣＣ－２５、ｎＦｉｂ、およびＨｅｋａであり、これらは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の３、６、および／または２４

時間後に収穫された。試料は、上記のように、処理され、４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｎｏｖｅｘ　ＮｕＰＡＧＥゲル上で泳動された。ゲルは、本質的に上記のように、泳動され、転写され、そして染色された。

【０４９４】

４つの細胞系統についてのＩＤＨ１のレベル

転写後、ブロットは１５－２０分間乾燥され、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄された。次いで、これは、５％　ＢＳＡを有するＴＢＳＴ中のＩＤＨ１に対する一次抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ番号３９９７）（１：１０００希釈）を用いて、振盪しながら、４℃で一晩のインキュベーションによってプローブされた。ＩＤＨ１に対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、二次抗体（抗ウサギ；１：１０，０００希釈）を用いて、室温で１時間プローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とともにインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０４９５】

４つの異なる細胞系統におけるＡＴＰクエン酸リアーゼレベル

イソクエン酸デヒドロゲナーゼブロットが、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄された。次いで、これは、１：１０００希釈の５％　ＢＳＡ中のＡＴＰクエン酸リアーゼについてのウサギポリクローナル抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ番号４３３２）で、振盪しながら、４℃で一晩プローブされた。ＡＴＰクエン酸リアーゼに対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

異なる４つの細胞系統におけるアクチンレベル

ＡＴＰクエン酸リアーゼブロットが、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、１：５０００希釈の５％　ＢＳＡ中のアクチンに対する抗体（Ｓｉｇｍａ　カタログ番号Ａ５３１６、クローンＡＣ－７４）で、振盪しながら、室温で１時間プローブされた。アクチンに対する一次抗体との１時間のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗マウス；１：１０，０００希釈）でプロー

ブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０４９６】

ウェスタンブロット実験３

この実験において使用された細胞は、ＨｅｐＧ２細胞、ＨＡＳＭＣ細胞、およびＰＡＣＡ２細胞であり、これらは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の４８時間後に収穫された。この実験において（ウェスタンブロット実験３）、および本実施例において以下に記載される実験のすべてにおいて（すなわち、ウェスタンブロット実験４～９）、細胞は、５ｍＭ　グルコース（「５Ｇ」）または２２ｍＭ　グルコース（「２２Ｇ」）のいずれかでさらに処置された。細胞に由来する試料は処理され、そして上記のように４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｎｏｖｅｘ　ＮｕＰＡＧＥゲル上で泳動された。ゲルは、本質的に上記のように、泳動され、転写され、そして染色された。

【０４９７】

ＨＡＳＭＣ対ＰＡＣＡ２およびＨｅｐＧ２におけるＩＤＨ１、ＡＴＰクエン酸リアーゼ、およびアクチンレベル

ＩＤＨ１、ＡＴＰクエン酸リアーゼ、およびアクチンのレベルは、本質的に、上記のように、ＩＤＨ１、ＡＴＰクエン酸リアーゼ、およびアクチンに対する一次抗体でブロットをプローブすることによって決定された。

【０４９８】

ウェスタンブロット実験４

この実験において使用された細胞はＨｅｐＧ２であり、これらは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の２４または４８時間後に収穫された。試料は、上記のように、処理され、４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｎｏｖｅｘ　ＮｕＰＡＧＥゲル上で泳動された。ゲルは、本質的に上記のように、泳動され、転写され、そして染色された。

【０４９９】

ＨｅｐＧ２細胞における乳酸デヒドロゲナーゼレベル

転写後、各ブロットは１５－２０分間乾燥され、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。次いで、このブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で、室温で１時間ブロッキングされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、５％　ＢＳＡ中の乳酸デヒドロゲナーゼに対する一次抗体（ａｂｃａｍ　ａｂ２１０１；ポリクローナル）（１：１０００希釈）を用いて、振盪しながら、４℃で一晩のインキュベーションによってプローブされた。乳酸デヒドロゲナーゼに対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、二次抗体（ウサギ抗ヤギ；１：１０，０００希釈）を用いて、室温で１時間プローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とともにインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５００】

ＨｅｐＧ２細胞における筋肉型ピルビン酸キナーゼ（ＰＫＭ２）レベル

乳酸デヒドロゲナーゼブロットが、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。２つのブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化さ

れ、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、１：５００希釈の５％　ＢＳＡ中のピルビン酸キナーゼＭ２に対するウサギポリクローナル抗体（ＮＯＶＵＳ　ＢＩＯＬＯＧＩＣＡＬＳ　カタログ番号Ｈ００００５３１５－Ｄ０１Ｐ）で、振盪しながら、室温で１時間プローブされた。ピルビン酸キナーゼＭ２に対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、各ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５０１】

ＨｅｐＧ２細胞におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼβレベル

ピルビン酸キナーゼブロットが、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。２つのブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。抗体が剥がされたことおよびＥＣＦ試薬が働いたことを確認した後、ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、１：５０００希釈の５％　ＢＳＡ中のピルビン酸デヒドロゲナーゼに対する抗体（ＡＢＮＯＶＡ　カタログ番号Ｈ０００００５１６２－Ｍ０３）で、振盪しながら、４℃で一晩プローブされた。ピルビン酸デヒドロゲナーゼに対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗マウス；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、各ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５０２】

ＨｅｐＧ２細胞におけるアクチンレベル

ピルビン酸デヒドロゲナーゼブロットは、本質的に上記のように、剥がされ、次いで、アクチンについて再プローブされた。

【０５０３】

ウェスタンブロット実験５

この実験において使用された細胞はＭＩＡＰＡＣＡ２（ＰＡＣＡ２）であり、これらは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の２４または４８時間後に収穫された。ＰＡＣＡ２試料は、本質的に上記のように、処理され、そしてゲルは、泳動され、転写され、染色され、そしてスキャンされた。

【０５０４】

ＰａＣａ２細胞中の乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ（ＰＤＨ）レベル

ＬＤＨおよびＰＤＨのレベルは、本質的に上記のように、ＬＤＨおよびＰＤＨに対する一次抗体でブロットを連続的にプローブすることによって決定された。

【０５０５】

ＰａＣａ２細胞におけるカスパーゼ３レベル

ブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。２つのブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、５％　ＢＳＡ中のカスパーゼ３に対する抗体（Ｓａｎｔａｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ番号ｓｃ７２７２、１：２００希釈）で、振盪しながら、４℃で一晩プローブされた。カスパーゼ３に対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗マウス；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、各ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５０６】

ウェスタンブロット実験６

このウェスタンブロット実験において使用された細胞はＰＣ－３、ＨｅｐＧ２、ＭＣＦ－７、ＨＤＦａ、およびＰＡＣＡ２であり、これらは、２コエンザイムＱ１０　ＩＶ製剤で処置されるかまたは処置されず、そして処置の２４時間後に収穫された。本質的に上記のように、試料は処理され、ゲルは泳動され、転写され、染色され、そしてスキャンされた。

【０５０７】

異なる細胞型におけるカスパーゼ（Ｃａｐａｓｅ）３およびアクチンレベル

カスパーゼ３およびアクチンのレベルは、本質的に上記に記載されるように、カスパーゼ３およびアクチンに対する一次抗体を用いて、ブロットを連続的にプローブすることによって決定された。

【０５０８】

ウェスタンブロット実験７

この実験において使用された細胞はヒト大動脈平滑筋（ＨＡＳＭＣ）細胞であり、これは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の２４または４８時間後に収穫された。本質的に上記のように、ＨＡＳＭＣ試料は処置され、ゲルは、泳動され、転写され、染色され、そしてスキャンされた。

【０５０９】

アクチンのための実験プロトコル：

アクチンのレベルは、本質的に上記のように、アクチンに対する一次抗体でブロットをプローブすることによって決定された。

【０５１０】

Ｈｉｆ　１α、カスパーゼ３、およびＰＤＨＢのための実験プロトコル：

アクチンブロットが、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、１：２００希釈の５％　ＢＳＡ中のＨｉｆ　１α、カスパーゼ３、またはＰＤＨＢに対する抗体で、穏やかに振盪しながら、４℃で一晩プローブされた。Ｈｉ

ｆ　１αに対する一次抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ２１８５；抗ウサギ）は、５％　ＢＳＡ中で１：５００希釈であった。カスパーゼ３に対する一次抗体（Ｓａｎｔａｃｒｕｚ　ｓｃ７２７２；抗ウサギ）は、５％　ＢＳＡ中で１：２００希釈であった。ピルビン酸デヒドロゲナーゼβ（ＰＤＨＢ）に対する一次抗体（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ　Ｈ０００００５１６２－Ｍ０３；抗マウス）は、５％　ＢＳＡ中で１：５００希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、室温にて１時間、二次抗体（ＰＤＨＢ抗マウス；Ｈｉｆ　１ａ、およびカスパーゼ３抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、各ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１１】

ＰＫＭ２、ＳＤＨＢ、およびＳＤＨＣのための実験プロトコル：

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、ＴＢＳ－Ｔ中の５％　ＢＳＡ中のＰＫＭ２、ＳＤＨＢ、またはＳＤＨＣに対する一次抗体で、穏やかに振盪しながら、インキュベーションにより、４℃で一晩プローブされた。ＳＤＨＣに対する一次抗体（ＡＢＮＯＶＡ　Ｈ０００００６３９１－Ｍ０２；抗マウス）は１：５００希釈であった。ＳＤＨＢに対する一次抗体は、Ａｂｃａｍ　ａｂ４７１４－２００から；抗マウス；１：１０００希釈であっった。ピルビン酸キナーゼＭ２（ＰＫＭ２）に対する一次抗体は、Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ　Ｈ０００００５３１５－Ｄ０ＩＰから；抗ウサギ；１：５００希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（ＳＤＨＢ＆Ｃ　抗マウス；およびＰＫＭ２　抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１２】

ＬＤＨおよびＢｉｋのための実験プロトコル：

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、５％　ＢＳＡ中のＬＤＨまたはＢｉｋに対する一次抗体で、穏やかに振盪しながら、インキュベーションにより、４℃で一晩プローブされた。ＬＤＨに対する一次抗体はＡｂｃａｍ　ａｂ２１０１から；抗ヤギ；１：１０００希釈であった。Ｂｉｋに対する一次抗体は、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ番号９９４２から；抗ウサギ；１：１０００希釈であった。一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間

、二次抗体（ＬＤＨ抗ヤギ；Ｊａｃｋｓｏｎ　ＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓおよびＢｉｋ抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１３】

ウェスタンブロット実験９

使用された細胞はＨｅｐＧ２細胞であり、これは、２つの異なる濃度、５０μＭおよび１００μＭでコエンザイムＱ１０で処置されるかまたは処置されず、そして処置の２４または４８時間後に収穫された。本質的に上記のように、ＨｅｐＧ２試料は処理され、ゲルは、泳動され、転写され、染色され、そしてスキャンされた。

【０５１４】

アクチンのための実験プロトコル：

アクチンのレベルは、本質的に上記のように、アクチンに対する一次抗体でブロットをプローブすることによって決定された。

【０５１５】

カスパーゼ３およびＭＭＰ－６のための実験プロトコル：

アクチンブロットが、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、５％　ＢＳＡ中のカスパーゼ３またはＭＭＰ－６に対する抗体で、穏やかに振盪しながら、インキュベーションにより、４℃で一晩プローブされた。カスパーゼ３に対する一次抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ４４９７６－１００；抗ウサギ）は５％　ＢＳＡ中１：５００希釈であった。ＭＭＰ－６に対する一次抗体（Ｓａｎｔａｃｒｕｚ　ｓｃＭＭ００２９－ＺＢ５；抗マウス）は５％　ＢＳＡ中１：１００希釈であった。一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、室温にて１時間、二次抗体（ＭＭＰ－６　抗マウス；カスパーゼ３　抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１６】

ＬＤＨのための実験プロトコル：

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、穏やかに振盪を伴う、５％　ＢＳＡ中または５％　ミルク中のＬＤＨに対する一次抗体とのインキュベーションによって、４℃で一晩プローブされた。ＬＤＨ　０８０３０９ｂ１に対する一次抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ２１０１；抗ヤギ）は５％　ＢＳＡ中１：１０００希釈であった。ＬＤＨ　０８０３０９ｂ２に対する一次抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ２１０１；抗ヤギ）は５％　ミルク中１：１０００希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、二次

抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ 抗ヤギ；１：１０，０００希釈；３０５－０５５－０４５）で１時間プローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００ Ｆｕｊｉ Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１７】

トランスアルドラーゼおよびＨｉｆ１ａのための実験プロトコル：

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、穏やかに振盪しながら、４℃で一晩のインキュベーションによって、５％ＢＳＡ中のトランスアルドラーゼまたはＨｉｆ１ａに対する一次抗体で一晩プローブされた。トランスアルドラーゼに対する抗体（Ａｂｃａｍ ａｂ６７４６７；抗マウス）は１：５００希釈であった。Ｈｉｆ１ａに対する抗体（Ａｂｃａｍ ａｂ２１８５；抗ウサギ）は１：５００希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗マウスまたは抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００ Ｆｕｊｉ Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１８】

ＩＧＦＢＰ３およびＴＰ５３のための実験プロトコル：

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、穏やかに振盪しながら、４℃で一晩のインキュベーションによって、５％ＢＳＡ中のＩＧＦＢＰ３またはＴＰ５３に対する一次抗体で一晩プローブされた。ＩＧＦＢＰ３に対する一次抗体（Ａｂｃａｍ ａｂ７６００１；抗ウサギ）は１：１００希釈であった。ＴＰ５３に対する一次抗体（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ ＡＶ０２０５５；抗ウサギ）は１：１００希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗ウサギ；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００ Ｆｕｊｉ Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５１９】

トランスアルドラーゼおよびＰＤＨＢのための実験プロトコル：

上記のブロットは、メタノールと３０分間インキュベートされ、続いて２回のＴＢＳ－Ｔを用いる１０分間の洗浄、次いで５０℃のストリッピング緩衝液との３０分間のインキュベーション、続いて、１００ｍｌ以上のＴＢＳ－Ｔを用いる各３０分間の２回の洗浄によって剥がされた。ブロットは、メタノールで５秒間活性化され、水で５分間、そしてＴ

ＢＳＴで１５分間洗浄された。ブロットは、ＴＢＳ－Ｔ中の５％ブロッキング試薬で室温で１時間ブロックされ、次いで、ＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、そして、穏やかに振盪しながら、４℃で一晩のインキュベーションによって、５％ＢＳＡ中のトランスアルドラーゼまたはＰＤＨＢに対する一次抗体で一晩プローブされた。トランスアルドラーゼに対する一次抗体（Ｓａｎｔａｃｒｕｚ　ｓｃ５１４４０；抗ヤギ）は１：２００希釈であった。ＰＤＨＢに対する一次抗体（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ　Ｈ０００００５１６２－Ｍ０３；抗マウス）は１：５００希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて１時間、二次抗体（抗ヤギまたは抗マウス；１：１０，０００希釈）でプローブされた。二次抗体との１時間のインキュベーション後、ブロットはＴＢＳ－Ｔ（１×－１５’；２×各５’）で３回洗浄され、次いで、５分間、ＥＣＦ試薬とインキュベートされ、次いで、各ブロットは、５１００　Ｆｕｊｉ　Ｌａｓｅｒスキャナーで、２５μＭ解像度、１６ビット、緑色レーザー、４００Ｖ、および５００Ｖでスキャンされた。

【０５２０】

結果

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ－１－（ＩＤＨ－１）

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ－１－（ＩＤＨ－１）は、ミトコンドリア基質の中に通常存在するＴＣＡ回路の一部である酵素の１つである。しかし、ＩＤＨ１は、イソクエン酸からα－ケトグルタル酸への酸化的脱カルボキシル化を触媒し、２段階工程で二酸化炭素を生成する細胞質ゾル型の酵素である。ＩＤＨ１は、細胞質ゾルおよびペルオキシソームに存在するＮＡＤＰ＋依存性型である。ＩＤＨ１はＳｅｒ１１３リン酸化によって不活性化され、クエン酸回路がないものを含む多くの種において発現される。ＩＤＨ１は、部分的にＨＩＦ－１の活性化を通して、不活性化が腫瘍形成に寄与する腫瘍抑制因子として通常は機能しているようである（Ｂａｙｌｅｙ　２０１０；Ｒｅｉｔｍａｎ，２０１０）。最近の研究は、膠芽細胞腫の病因学におけるＩＤＨ１の不活性化変異に関わっている（Ｂｌｅｅｋｅｒ，２００９；Ｂｌｅｅｋｅｒ，２０１０）。

【０５２１】

コエンザイムＱ１０での処置は、ＭＣＦ－７、ＳＫＭＥＬ２８、ＨｅｐＧ２、およびＰａＣａ－２細胞を含む癌細胞株におけるＩＤＨ１の発現を増加した。ＳＣＣ２５細胞系統においては中程度の発現の増加が存在した。ヒト由来初代線維芽細胞ＨＤＦａとは対照的に、ｎＦＩＢおよびヒト大動脈平滑筋細胞ＨＡＳＭＣは、コエンザイムＱ１０に応答して、ＩＤＨ１の発現パターンの有意な変化を実証しなかった。α－ケトグルタル酸（α－ＫＧ）は、ＴＣＡ回路における重要な中間体であり、イソクエン酸から生化学的に合成され、最終的にはスクシニルＣｏＡに転換され、薬物となり得るＭＩＭおよびエピシフターである。α－ＫＧはＴＣＡ回路の中間体を補充するために細胞によって使用でき、酸化的リン酸化を増加するための還元当量の生成を生じるので、α－ＫＧの生成はＴＣＡ回路における決定的な岐路として働く。したがって、コエンザイムＱ１０媒介性のＩＤＨ１発現の増加は、癌細胞における酸化的リン酸化を増強するためにミトコンドリアのＴＣＡ回路によって使用できる中間体の形成を生じる。結果は以下の表３０～３２に要約される。

【表３０】

表３０　ＨＤＦａおよびＭＣＦ－７中のＩＤＨ１

組成	平均標準化強度
ＨＤＦ、培地	３４６
ＨＤＦ２４－５０－コエンザイムＱ１０	５１９
ＨＤＦ２４－１００－コエンザイムＱ１０	６００
ＭＣＦ、培地	２２１
ＭＣＦ２４－５０－コエンザイムＱ１０	３３６
ＭＣＦ２４－１００－コエンザイムＱ１０	６４９

【表３１】

表３１　処理後のＨｅｐＧ２中のＩＤＨ１に対するＨＡＳＭＣ中のＩＤＨ１

量－組成	標準化強度
ＨＡＳ５ｇ４８－培地	２０
ＨＡＳ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	９４８
ＨＡＳ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１８６４
ＨＡＳ２２Ｇ４８－培地	１９１７
ＨＡＳ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１３７０
ＨＡＳ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１０２３
Ｈｅｐ５ｇ４８－培地	１４８９２
Ｈｅｐ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１４１０６
Ｈｅｐ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１５７７４
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－培地	１６５５８
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１５５３７
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	２７８７８

【表３２】

表３２　処理後のＰＡＣＡ２中のＩＤＨ１に対するＨＡＳＭＣ中のＩＤＨ１

量－組成	標準化強度
ＨＡＳ５ｇ４８－培地	５６２
ＨＡＳ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	５０９
ＨＡＳ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	６２７
ＨＡＳ２２Ｇ４８－培地	８２２
ＨＡＳ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１０２８
ＨＡＳ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１０１５
ＰＡＣＡ５ｇ４８－培地	１０９５
ＰＡＣＡ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１０９５
ＰＡＣＡ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	８６０
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－培地	１１０３
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１５０３
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１６３０

【０５２２】

ＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＣＬ）

ＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＣＬ）は、細胞質ゾル中でアセチル－ＣｏＡおよびオキサロ酢酸の形成を触媒するホモテトラマー（～１２６ｋｄ）酵素である。この反応は、糖生成と同様に、脂肪酸、コレステロール、およびアセチルコリンの生合成のための最初の非常に重要なステップである（Ｔｏｗｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。栄養およびホルモンがこの重要な酵素の発現レベルおよびリン酸化状態を調節している。ＡｋｔおよびＰＫＡによるＡＣＬのＳｅｒ４５４リン酸化が報告されている（Ｂｅｒｗｉｃｋ．，ＤＣ　ＭＷ　ｅｔ　ａｌ．，２００２；Ｐｉｅｒｃｅ　ＭＷ　ｅｔ　ａｌ．，１９８２）。

【０５２３】

データは、正常細胞および癌細胞におけるＡＴＰクエン酸リアーゼに対するコエンザイムＱ１０の効果を説明している。癌細胞において、ＡＣＬ酵素の発現の用量依存的な減少が存在することが一貫して観察されている。対照的に、正常細胞においては、ＡＣＬの発現の増加に向かう傾向が存在するようである。細胞質ゾルＡＣＬは、増殖因子刺激の間および分化の間に、細胞におけるヒストンアセチル化のために必須であることが実証されてきた。新生物プロセスにおいて重要なプロセスであるヒストンアセチル化のために必須であるアセチルＣｏＡを生成するために、ＡＣＬが細胞質ゾルのグルコース由来のクエン酸を利用するという事実は、癌細胞機能に影響を与える際のコエンザイムＱ１０誘導ＡＣＬ

発現の役割を実証する。細胞質ゾルＡＣＬによってクエン酸から生成されたアセチル－ＣｏＡは、細胞分裂の間の新たな脂質およびコレステロールの生合成のための供給源として働く。したがって、コエンザイムＱ１０で誘導されるＡＣＬ発現の変化は、癌細胞に対して正常細胞における脂質およびコレステロールの合成のためのアセチルＣｏＡの利用可能性を変化させる。結果は以下の表３３～３６に要約される。

【表３３】

表３３　ＨＤＦａ中のＡＴＰＣＬおよびＭＣＦ－７中のＡＴＰＣＬ

組成	平均標準化強度
ＨＤＦ－培地	～　１５０００
ＨＤＦ－５０－コエンザイムＱ１０	～　１７５００
ＨＤＦ－１００－コエンザイムＱ１０	～　２５０００
ＭＣＦ－培地	～　７５００
ＭＣＦ－５０－コエンザイムＱ１０	～　７５００
ＭＣＦ－１００－コエンザイムＱ１０	～　１２５００

【表３４】

表３４　ＨｅｐＧ２のＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＴＰ　Ｃｉｔｒａｔｅ　Ｌｙｓａｓｅ）のおおよそのバンドの大きさ（ｋｄ）に対するＨＡＳＭＣ中のＡＴＰクエン酸リアーゼのおおよそのバンドの大きさ（ｋｄ）

量－組成	標準化強度
ＨＡＳ５ｇ４８－培地	２４５５７
ＨＡＳ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	２３３４１
ＨＡＳ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	２５５４４
ＨＡＳ２２Ｇ４８－培地	２７０１４
ＨＡＳ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	２１４３９
ＨＡＳ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１９４９１
Ｈｅｐ５ｇ４８－培地	２８３７７
Ｈｅｐ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	２４１０６
Ｈｅｐ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	２２４６３
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－培地	２４２６２
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	３１２３５
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	５０５８８

【表３５】

表３５　ＰＡＣＡ２中のＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＴＰ　Ｃｉｔｒａｔｅ　Ｌｙｓａｓｅ）のおおよそのバンドの大きさ（ｋｄ）に対するＨＡＳＭＣ中のＡＴＰクエン酸リアーゼのおおよそのバンドの大きさ（ｋｄ）

量－組成	標準化強度
ＨＡＳ５ｇ４８－培地	１１０３６
ＨＡＳ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１２０５６
ＨＡＳ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１５２６５
ＨＡＳ２２Ｇ４８－培地	１８２７０
ＨＡＳ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１５８５７
ＨＡＳ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１３８９２
ＰＡＣＡ５ｇ４８－培地	１１７２７
ＰＡＣＡ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	８０２７
ＰＡＣＡ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	４９４２
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－培地	８５４１
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	９５３７
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１４９０１

【表３６】

表３６　ＣＴＲＬの百分率（％）としての、ＨｅｐＧ２中のＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＴＰ　Ｃｉｔｒａｔｅ　Ｌｙｓａｓｅ）およびＰＡＣＡ２中のＡＴＰクエン酸リアーゼ

量－組成	標準化強度
ＰＡＣＡ５ｇ４８－培地	１．００
ＰＡＣＡ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	０．６８
ＰＡＣＡ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	０．４２
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－培地	１．００
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１．１２
ＰＡＣＡ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１．７４
Ｈｅｐ５ｇ４８－培地	１．００
Ｈｅｐ５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	０．８５
Ｈｅｐ５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	０．７９
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－培地	１．００
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１．２９
Ｈｅｐ２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	２．０９

【０５２４】

ピルビン酸キナーゼＭ２（ＰＫＭ２）

ピルビン酸キナーゼは、解糖経路に関わる酵素である。これは、ホスホエノールピルビン酸（ＰＥＰ）からアデノシン二リン酸（ＡＤＰ）へのリン酸の転移の原因であり、ＡＴＰおよびピルビン酸を生成する。ＰＫＭ２は、解糖のピルビン酸キナーゼのアイソザイムであり、その発現は組織の代謝機能によって特徴付けられ、すなわち、Ｍ２アイソザイムは、胚細胞などの高いエネルギーの必要性を伴う正常細胞を迅速に増殖させる際に発現され、高い率の核酸合成を必要とする肺細胞および膵島細胞などの少数の分化した正常細胞においてもまた発現される。ＰＫＭ２は、細胞のエネルギーの要求に合致するために解糖経路に対するそれらの依存性に起因して、腫瘍細胞中で高度に発現されている。通常は胚に限定されていると考えられているＰＫＭ２アイソフォームは、癌性細胞中で再発現されている。ＰＫＭ２を発現する細胞は、より強力な好気性解糖表現型を好み（代謝表現型のシフトを示す）、乳酸産生の増加および酸化的リン酸化の減少を伴う。したがって、癌細胞におけるＰＫＭ２の発現の減少は、解糖経路を経由してエネルギー生成をシフトまたは

下方調節し、これは、癌の処置において有用であるストラテジーである。データは、正常細胞および癌細胞におけるＰＫＭ２の変動する発現パターンを実証し、癌細胞は正常と比較してより高いレベルの発現を実証する。コエンザイムＱ１０での細胞の処置は、正常細胞および癌細胞において、ＰＫＭ２のより上側のおよびより下側のバンドレベルの発現パターンを変化させた。試験された癌細胞においてＰＫＭ２発現の用量依存的な減少が存在し、および癌細胞において大きな変化は観察されなかった。結果は以下の表３７～３９に要約される。

【表３７】

表３７　ＨｅｐＧ２中の２つの上部のバンド由来の筋ピルビン酸キナーゼ

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化強度（４８時間）
５ｇ－培地	２８３８６	４１３
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	２９２６９	３０３
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	１８３０７	３５４
２２Ｇ－培地	２５９０３	６５９
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	２２２９４	５６２
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	１９５６０	６０１

【表３８】

表３８　ＨｅｐＧ２中の２つの下部のバンド（５８ＫＤ）由来の筋ピルビン酸キナーゼ

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化体積（４８時間）
５ｇ－培地	１０４８３	３１０
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	１１１９７	１８５
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	７６４２	１２２
２２Ｇ－培地	９１５０	３０６
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	６３０２	３４４
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	６９０４	４６５

【表３９】

表３９　処理後のＨＡＳＭＣ細胞中の２つの上部のバンド由来の筋ピルビン酸キナーゼ

量－組成	標準化強度
５ｇ４８－培地	６０８
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	８１１
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	６１１
２２Ｇ４８－培地	５１６
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	５９５
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	４９６
２２Ｇ２４－培地	３０１
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	４７７
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	７０１

【０５２５】

乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）

ＬＤＨは、ＮＡＤＨ　およびＮＡＤ$^{+}$の同時相互変換を伴う、ピルビン酸および乳酸の相互交換を触媒する酵素である。これは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を負担して、還元当量の生成およびＡＴＰ生成のための低い細胞酸素の緊張の下で、ピルビン酸をラクテート（乳酸）に転換する能力を有する。癌細胞は、典型的には、ＡＴＰおよび還元当量および還元ミトコンドリアＯＸＰＨＯＳを生成するために解糖流入を維持するためにＬＤＨの発現の増加を実証する。したがって、癌細胞における還元当量は、ＴＣＡ回路にピルビン酸が入ることを容易にするための乳酸の生成から代謝をシフトする。コエンザイムＱ

１０を用いる処置は、癌における乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）発現を減少させ、これは正常細胞においては最小の効果を伴うものであり、細胞質ピルビン酸から乳酸への転換を最小化することによって、解糖からミトコンドリアＯＸＰＨＯＳへのＡＴＰの生成のための癌細胞の生体エネルギーのシフトを誘発する際のコエンザイムＱ１０の役割を支持する。結果は以下の表４０～４２に要約される。

【表４０】

表４０　ＨｅｐＧ２中の乳酸デヒドロゲナーゼ

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化体積（４８時間）
５ｇ－培地	７９８１	５９９７
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	７９００	５１８８
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	６６１６	７３１９
２２Ｇ－培地	９１７１	７５２７
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	７５５０	６１７３
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	７１２４	９１４１

【表４１】

表４１　２回の実験による、対照に対する百分率（％）としての
ＨｅｐＧ２中の乳酸デヒドロゲナーゼ

量－組成	対照％としての平均体積
５ｇ２４－培地	１．００
５ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	０．６４
５ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	１．０６
５ｇ４８－培地	１．００
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１．１２
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１．２１
２２Ｇ２４－培地	１．００
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	１．２１
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	１．４４
２２Ｇ４８－培地	１．００
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	０．９５
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	０．６７

【表４２】

表４２　ＰＡＣＡ２中の乳酸デヒドロゲナーゼ

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化体積（４８時間）
５ｇ－培地	２１２２	２３６０
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	５０６８	２９７８
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	３６７５	２３９６
２２Ｇ－培地	４４９９	２３３２
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	１０２１８	２５７５
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	７１５８	３５５７

【０５２６】

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ－Ｂ（ＰＤＨ－Ｅ１）

ピルビン酸デヒドロゲナーゼベータ（ＰＤＨ－Ｅ１）は、ピルビン酸をアセチルＣｏＡに転換するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体（ＰＤＣ）の一部である第１の酵素成分である。ＰＤＨ－Ｅ１は、その活性のためにチアミンをコファクターとして必要とし、ミトコンドリアにおけるＴＣＡサイクルに入るためにピルビン酸からアセチルＣｏＡへの転換のために必須であるＰＤＣ複合体における最初の２つの生化学反応を実施する。したがって、癌細胞におけるＰＤＨ－Ｅ１の発現の増加に伴って、同時に起こるＰＫＭ２およびＬ

ＤＨの発現の減少は、ＡＴＰの生成のためにミトコンドリアＯＸＰＨＯＳを増強することに向けてピルビン酸が入ることの速度を増強する。データは、正常細胞および癌細胞系統におけるＰＤＨ－Ｅ１の発現のために、この酵素のベースライン発現が、正常細胞と比較して、癌細胞で減少されていることを示す。コエンザイムＱ１０を用いる処置は、癌細胞におけるＰＤＨ－Ｅ１タンパク質の発現の進行的な増加に関連し、正常細胞においては最小限の変化を伴う。結果は以下の表４３～４５に要約される。

【表４３】

表４３　ＨｅｐＧ２中のピルビン酸デヒドロゲナーゼβ

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化体積（４８時間）
５ｇ－培地	５１７	１００
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	９２１	１２３
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	４３３	２０５
２２Ｇ－培地	４８４	１８１
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	４２６	２３２
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	３４０	４５６

【表４４】

表４４　ＰＡＣＡ２中のピルビン酸デヒドロゲナーゼβ

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化体積（４８時間）
５ｇ－培地	３２３	３７５
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	４９２	３３９
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	４６７	２５２
２２Ｇ－培地	５７２	２７６
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	９２４	２７９
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	１２０１	３８５

【表４５】

表４５　処理後のＨＡＳＭＣ中のピルビン酸デヒドロゲナーゼβ

量－組成	標準化体積
５ｇ４８－培地	１４０
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１４７
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１４７
２２Ｇ４８－培地	１７４
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１４９
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１２３
２２Ｇ２４－培地	１４０
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	１４５
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	１５０

【０５２７】

カスパーゼ３

アポトーシスの開始の制御は、しばしば、開始因子のカスパーゼである、カスパーゼ－２、－９、および－８／１０のレベルで発揮される。外部のアポトーシスの経路において、カスパーゼ－８は、一旦活性になると、実行因子のカスパーゼ（例えば、カスパーゼ－３）を直接切断し、活性化する。活性型カスパーゼ－３は、他のカスパーゼ（６、７、および９）ならびに細胞中の関連する標的（例えば、ＰＡＲＰおよびＤＦＦ）を活性化する。これらの研究において、エフェクターカスパーゼ－３タンパク質のレベルは、コエンザイムＱ１０に応答して、癌細胞系統および正常細胞系統において測定された。アポトーシスの制御は開始因子カスパーゼを通してであり、その代わりに、多数のシグナル伝達経路が、エフェクターカスパーゼの直接阻害を通してアポトーシスシグナルの伝達を遮断する

ことが注目されるべきである。例えば、ｐ３８　ＭＡＰＫは、カスパーゼ－３をリン酸化し、その活性を抑制する（Ａｌｖａｒａｄｏ－Ｋｒｉｓｔｅｎｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。興味深いことに、同じ研究におけるタンパク質ホスファターゼ（ＰＰ２Ａ）またはプロテインキナーゼＣデルタ（ＰＫＣデルタ）の活性化（Ｖｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）は、カスパーゼ－３活性化を増幅し、そしてアポトーシスシグナルの伝達を強化するように、ｐ３８　ＭＡＰＫの効果と反対に作用できる。それゆえに、カスパーゼ－３活性化のレベルにおける事象またはカスパーゼ３活性化後の事象は、いくつかの場合において細胞の究極の運命を決定するかもしれない。

【０５２８】

カスパーゼ－３はシステイン－アスパラギン酸プロテアーゼであり、これは、細胞アポトーシスの実行フェーズで中心的な役割を果たす。癌細胞におけるカスパーゼ３のレベルは、コエンザイムＱ１０処置に伴って増加される。対照的に、正常細胞におけるカスパーゼ－３の発現は、正常細胞において中程度に減少された。結果は以下の表４６～４８に要約される。

【表４６】

表４６　ＰＡＣＡ２中のカスパーゼ３

量－組成	標準化体積（２４時間）	標準化体積（４８時間）
５ｇ－培地	３２４	３００
５ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	３２５	７０１
５ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	３７４	２９１
２２Ｇ－培地	３４４	１３５
２２Ｇ－５０－コエンザイムＱ１０	６７５	４９７
２２Ｇ－１００－コエンザイムＱ１０	８４２	５５９

【表４７】

表４７　２回の実験による、対照に対する百分率（％）としてのＨｅｐＧ２中のカスパーゼ３

量－組成	対照の％としての標準化体積
５ｇ２４－培地	１．．００
５ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	１．０８
５ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	１．７６
５ｇ４８－培地	１．００
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１．４４
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	０．９５
２２Ｇ２４－培地	１．００
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	１．３９
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	１．７８
２２Ｇ４８－培地	１．００
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１．５０
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１．４５

【表４８】

表４８　処理後のＨＡＳＭＣ中のカスパーゼ３

量－組成	標準化体積
５ｇ４８－培地	６５８
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	７６６
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	６６９
２２Ｇ４８－培地	８４６
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	６３９
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	６２４
２２Ｇ２４－培地	９８２
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	８３５
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	８６５

【０５２９】

コハク酸デヒドロゲナーゼ（ＳＤＨ）

コハク酸－コエンザイムＱ還元酵素としてもまた知られるコハク酸デヒドロゲナーゼは、ＴＣＡと電子伝達系の両方に関わるミトコンドリア内膜の複合体である。ＴＣＡにおいては、この複合体は、ユビキノンからユビキノールへの同時に起こる還元に伴って、コハク酸からフマル酸への酸化を触媒する（Ｂａｙｓａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０００；およびＴｏｍｌｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２００２）。ＳＤＨのＢ、Ｃ、およびＤサブユニットにおける生殖系列突然変異は、家族性傍神経節腫または平滑筋腫の開始事象であることが見い出された（Ｂａｙｓａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０００）。

【０５３０】

ウェスタンブロッティング分析は、コエンザイムＱ１０で処置された癌細胞のミトコンドリア調製物においてＳＤＨ　サブユニットＢの発現を特徴付けるために使用された。結果は、コエンザイムＱ１０処置が、細胞のミトコンドリアにおけるＳＤＨタンパク質レベルの増加に関連することを示唆する。これらの結果は、コエンザイムＱ１０の作用のメカニズムの１つがＴＣＡ回路およびミトコンドリアに向かう細胞の代謝を、ＳＤＨＢなどのミトコンドリア酵素のレベルを増加することによってシフトされることを示唆する。結果は以下の表４９に要約される。

【表４９】

表４９　ＮＣＩＥ０８０８　Ｍｉｔｏｐｒｅｐｓ中のコハク酸デヒドロゲナーゼＢ

組成－時間	平均標準化体積
培地	５３１
５０ｕＭ　コエンザイムＱ１０、３時間	６３４
１００ｕＭ　コエンザイムＱ１０、３時間	９６４
５０ｕＭ　コエンザイムＱ１０、６時間	１０７７
１００ｕＭ　コエンザイムＱ１０、６時間	９３４

【０５３１】

低酸素誘導因子－１

低酸素誘導因子（Ｈｉｆ）は、αおよびβサブユニットから構成される転写因子である。酸素正常状態下では、Ｈｉｆ１αのタンパク質レベルは、翻訳後事象の結果を介するその連続的な分解により、非常に低い。解糖と酸化的リン酸化の間のシフトは、一般的には、ピルビン酸の異化的な運命を決定する２つの酵素ＰＤＨおよびＬＤＨの相対的な活性によって制御されると考えられる。Ｈｉｆは、ＰＤＫを刺激することによって、ＬＤＨレベルを誘導し、ＰＤＨ活性を阻害することによって、この決定的な分岐（ｂｉｆｕｒｇａｔｉｏｎ）点を制御する。ミトコンドリアから細胞質ゾルにピルビン酸代謝を迂回させるこの能力により、Ｈｉｆは、癌細胞における生体エネルギーのスイッチの決定的な媒介因子

であると考えられる。

【０５３２】

コエンザイムＱ１０での処置は、癌細胞のミトコンドリア調製物において、後でのＨｉｆ１αタンパク質レベルを減少させた。正常細胞の全細胞溶解物において、Ｈｉｆ１αの下側のバンドが観察され、同様に減少を示した。結果は以下の表５０～５１に要約される。

【表５０】

表５０　処理後のＨＡＳＭＣ細胞中のＨｉｆ１αの下部のバンド

量－組成	標準化体積
５ｇ４８－培地	２２２４４
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	２１６６４
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１９５４０
２２Ｇ４８－培地	１４７５２
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	１７４９６
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	２３１１１
２２Ｇ２４－培地	２１０７３
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	１８４８６
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	１７９１９

【表５１】

表５１　処理後のＨｅｐＧ２中のＨｉｆ１αの上部のバンド

量－組成	標準化体積
５ｇ２４－培地	１２１８６
５ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	８９９８
５ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	９３１５
５ｇ４８－培地	８８６８
５ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	８６０１
５ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	１０１９２
２２Ｇ２４－培地	１１７４８
２２Ｇ２４－５０－コエンザイムＱ１０	１４０８９
２２Ｇ２４－１００－コエンザイムＱ１０	８５３０
２２Ｇ４８－培地	８６９５
２２Ｇ４８－５０－コエンザイムＱ１０	９４１６
２２Ｇ４８－１００－コエンザイムＱ１０	５６０８

【０５３３】

実施例２２　ＣｏＱ１０で処置された正常細胞および癌細胞における酸素消費速度（ＯＣＲ）および細胞外酸性化（ＥＣＡＲ）の分析

この実施例は、ストレッサー（例えば、高血糖、低酸素、乳酸）の非存在下および／または存在下で、本発明の代表的なＭＩＭ／エピシフター－ＣｏＱ１０－による処置への細胞の曝露が、正常な生理学的条件下での正常細胞において観察される値を代表する解糖／乳酸生合成およびミトコンドリア酸化的リン酸化（ＥＣＡＲおよびＯＣＲ値によって測定されるような）へのシフトと関連することを実証する。

【０５３４】

出願人は、癌細胞中のＣｏＱ１０での処置が、解糖および乳酸生合成の同時に起こる減少を伴う、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を増強する特定のタンパク質の発現の変化と関連することを先のセクションで実証した。この実施例は、インビトロ実験モデルにおける溶存酸素および細胞外ｐＨレベルを測定する機器であるＳｅａＨｏｒｓｅ　ＸＦ分析装置（ＳｅａＨｏｒｓｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ，Ｎｏｒｔｈ　Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）を使用して細胞系統において酸素消費速度（ＯＣＲ）を測定することによっ

て、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の直接測定を得ることができることを示す。

【０５３５】

細胞外微小環境のｐＨは、腫瘍中では、細胞内（細胞質）および周囲の正常組織のｐＨと比較して、比較的酸性である。この腫瘍の特徴は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）に侵入する能力、続いてシグナル伝達カスケードを開始する腫瘍転移の代表的な特質を含む複数の目的に役立ち、このシグナル伝達カスケードは、以下をさらに調節する：

・腫瘍の血管形成
・細胞周期のターンオーバーを制御する停止メカニズムの活性化の増加
・免疫監視に対する細胞の回避システムを容易にする免疫調節メカニズム
・解糖流入および乳酸利用への依存性を増加する代謝制御エレメント
・発癌性を増加させるように働く、Ｂｃｌ－２、ＩＡＰ、ＥｎｄｏＧ、ＡＩＦなどの重要なアポトーシス遺伝子ファミリーの異常調節。

【０５３６】

任意の特定の理論に束縛されることは望まないが、腫瘍における外部微小環境の酸性ｐＨは、解糖表現型の変化からの乳酸産生の増加に起因する、腫瘍細胞から押し出された水素イオン濃度の増加の結果である。

【０５３７】

この実験において、正常細胞系統におけるＯＣＲおよび細胞外酸性化速度（ＥＣＡＲ）は、ベースラインの値を決定するために、ＣｏＱ１０の存在下および非存在下で得られた。そのネイティブな栄養環境において、正常細胞系統における基礎ＯＣＲ速度は異なっており、通常は、身体中の細胞の生理学的役割の関数であることが観察された。

【０５３８】

例えば、１つのセットの実験は、ヒト成体皮膚線維芽細胞系統である、非癌性細胞系統ＨＤＦａを使用して実施された。線維芽細胞は、最初に合成され、組織のために構造フレームワーク（ストロマ）を形成する、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）成分およびコラーゲンを分泌する。加えて、線維芽細胞は、創傷治癒および局所的免疫調節などの多数の機能の組織の使節（ａｍｂａｓｓａｄｏｒｓ）として働くことが知られている。正常な生理学的条件下では、正常な線維芽細胞におけるエネルギー要求は、解糖と酸化的リン酸化の組み合わせを使用することに合致する－解糖はＥＣＭの合成のための必要な栄養を提供する。

【０５３９】

ＨＤＦａと対照的に、ＨＡＳＭＣ（ヒト大動脈平滑筋細胞）は、動脈、静脈、リンパ管、胃腸管、呼吸管、膀胱、および興奮－収縮結合の調節を受ける能力を有する他の組織において見い出される。ＨＡＳＭＣ細胞などの平滑筋の収縮を受ける能力はＡＴＰによって提供されるエネルギーを要求する。これらの組織は、ＡＴＰがミトコンドリアから供給され得る低いエネルギーモードから、迅速なＡＴＰの生成のために解糖に切り換えることによってエネルギーが提供される高エネルギーモード（運動／ストレスの間）に移行する。したがって、正常平滑筋細胞は、ミトコンドリアＯＸＰＨＯＳと解糖の組み合わせを使用でき、正常な生理学的環境下でのそれらのエネルギー要求を満たす。

【０５４０】

それらのそれぞれの生理学的役割（すなわち、ＨＤＦａおよびＨＡＳＭＣ）の違いは、ＳｅａＨｏｒｓｅ　ＸＦ分析装置を使用してこれらの細胞系統において測定される休止状態のＯＣＲ値で観察された。図２９および３０は、生理学的に正常なグルコース条件（約４．６ｍＭ）および高グルコース（高血糖）条件において増殖したＨＤＦａおよびＨＡＳＭＣ細胞におけるＯＣＲを記載する。

【０５４１】

通常の酸素利用能の下での任意の処置の非存在下でのＨＤＦａについてのベースラインＯＣＲ値は、５．５ｍＭグルコースの存在下で約４０ｐモル／分である（図２９）。この値は、細胞が２２ｍＭ　グルコースに維持されたときにわずかに上昇された。対照的に、ＨＡＳＭＣ細胞において、５．５ｍＭ　グルコースにおけるＯＣＲ値は約９０ピコモル／

分であり、ＯＣＲ値は、２２ｍＭ　グルコースの間に約４０ピコモル／分まで下降した。したがって、高血糖条件下では、ＨＤＦａとＨＡＳＭＣの間の示差的な応答が存在し、それらのそれぞれの生理学的な構成および機能における固有の違いをさらに実証する。

【０５４２】

細胞におけるＣｏＱ１０での処置は、正常（５ｍＭ）グルコース条件において観察された状態に代表的であるＯＣＲの変化と関連する。生理学的応答の複雑性は、低酸素緊張の存在下で混合される。したがって、ＣｏＱ１０曝露は、特定の細胞に対して固有である生理学的状態に向かう正常細胞中のＯＣＲ速度の変化と関連する。

【０５４３】

以下の表５２は、５．５ｍＭおよび２２ｍＭグルコースにおける正常酸素および低酸素条件下でのＣｏＱ１０の存在下または非存在下でのＨＤＦａ細胞におけるＥＣＡＲ値（ｍｐＨ／分）を記載する。正常細胞において、ＣｏＱ１０での処置は、それがたとえこれらの細胞においてＯＣＲに影響を与えたとしても、ＥＣＡＲ値に対して最小限の影響を有したことが観察できる。高グルコース低酸素条件において、ＣｏＱ１０での処置は、未処置の正常酸素条件において観察された値までの、上昇したＥＣＡＲの低下に関連した。

【表５２】

表５２　５．５ｍＭおよび２２ｍＭのグルコースの正常酸素圧条件および低酸素条件下、ＣｏＱ１０の非存在下および存在下にあるＨＤＦａ細胞中のＥＣＡＲ値

	正常酸素（5．5mM）		低酸素（5．5mM）		正常酸素（22mM）		低酸素（22mM）	
処置	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
未処置	5	1．32	5	0．62	5	0．62	9	0．81
50μM 31510	6	1．11	5	0．78	5	0．78	6	0．70
100μM 31510	6	0．76	5	1．19	5	1．19	8	1．07

【０５４４】

表５３において、ＨＡＳＭＣにおける測定されたベースラインＥＣＡＲ値（ｍｐＨ／分）はＨＤＦａのそれと比較して高かった。低酸素状態の誘導は、解糖の増加に続いて起こる細胞内低酸素誘導性アシドーシスと関連する可能性が最も高いＥＣＡＲの増加を引き起こした。

【表５３】

表５３　５．５ｍＭおよび２２ｍＭのグルコースの正常酸素圧条件および低酸素条件下、ＣｏＱ１０の非存在下および存在下にあるＨＡＳＭＣ細胞中のＥＣＡＲ値

	正常酸素（5．5mM）		低酸素（5．5mM）		正常酸素（22mM）		低酸素（22mM）	
処置	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
未処置	9	2．22	11	2．18	22	2．08	19	1．45
50μM 31510	9	2．13	11	2．54	21	1．72	17	1．60
100μM 31510	9	1．72	13	2．30	22	1．64	17	1．47

【０５４５】

ＣｏＱ１０での処置は、正常酸素での正常グルコース条件において観察される値に向けた低酸素条件における高血糖ＨＡＳＭＣ細胞におけるＥＣＡＲ速度の下向きの傾向と関連することが観察された。これらのデータは、特定の細胞の型の生理学的役割に固有である

生理学的変数、異常な状態において観察される変化（例えば、高血糖）の存在が、ＣｏＱ１０で処置されたときに正常に向けてシフトされることを実証する。

【０５４６】

対照的に、癌細胞（例えば、ＭＣＦ－７、ＰａＣａ－２）は、培養中の維持のための解糖表現型に起因して、正常細胞と比較してより高いレベルのグルコースでの培養に固有に準備されている。ＣｏＱ１０での処置は、ＯＣＲ値の一貫した減少を引き起こした（図３１および図３２）。

【０５４７】

ＭＣＦ－７およびＰａＣａ－２細胞におけるＯＣＲ値に対するＣｏＱ１０の効果は、正常ＨＤＦａおよびＨＡＳＭＣ細胞のそれと類似しており、この変動性応答は、癌細胞系統の個々の代謝プロフィールに基づいて治療応答を示唆するものであった。

【表５４】

表５４　５．５ｍＭおよび２２ｍＭのグルコースの正常酸素圧条件および低酸素条件下、ＣｏＱ１０の非存在下および存在下にあるＰａＣａ－２細胞中のＥＣＡＲ値

	正常酸素（１７mM）		低酸素（１７mM）		正常酸素（２２mM）		低酸素（２２mM）	
処置	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
未処置	２１	５．９７	１６	３．４１	２４	４．３５	３６	５．６５
５０μM 31510	１３	３．０８	１２	１．６６	２０	５．１５	２５	４．５８
１００μM 31510	１４	２．１４	１７	２．５９	１９	３．３８	３０	５．６２

【０５４８】

表５４は、ＰａＣａ－２細胞におけるＥＣＡＲ値を記載する。正常細胞と比較して、癌細胞は、ＡＴＰ生成のために高グルコースを使用するように表現型的に準備されており（解糖の増強）、２１ｍｐＨ／分でより高いＥＣＡＲを生じる（表５４、未処置正常酸素についてのＥＣＡＲ　１７ｍＭ）。ＣｏＱ１０での処置は、解糖で生成された乳酸の減少に付随する可能性が最も高い、これらの条件下でのＥＣＡＲ速度の有意な減少を生じる。これらの細胞におけるＯＣＲの関連する減少は、ミトコンドリアＯＸＰＨＯＳの効率の増加と最も関連したようであった。

【０５４９】

ＯＣＲおよびＥＣＡＲの同様の比較（データ示さず）は、ＨＡＥＣ（正常ヒト大動脈内皮細胞）、ＭＣＦ－７（乳癌）、ＨｅｐＧ２（肝臓癌）、および高度に転移性のＰＣ－３（前立腺癌）細胞系統を含む多数の他の正常細胞および癌細胞において決定された。試験された細胞系統のすべてにおいて、ストレッサー（例えば、高血糖、低酸素、乳酸）の非存在下および／または存在下でのＣｏＱ１０への曝露は、正常の生理学的条件下での正常細胞において観察される値に代表的なＯＣＲおよびＥＣＡＲの値のシフトと関連した。したがって、細胞死を含む、癌の処置におけるＣｏＱの全体的な効果は、解糖からミトコンドリアＯＸＰＨＯＳへの細胞の生体エネルギーのシフトと協調した、プロテオミクス的、ゲノム的、代謝学な結果に対するその集合的な影響の下流の効果である。

【０５５０】

実施例２３　ＣｏＱ１０の生合成のためのビルディングブロック分子

この実施例は、ＣｏＱ１０生合成の特定の前駆体、例えば、ベンゾキノン環の生合成のためのもの、およびイソプレノイド反復の生合成のためのもの、ならびにベンゾキノン環へのそれらの付属物（「ビルディングブロック成分」）が、単独で投与でき、もしくは標的細胞と組み合わせて投与でき、ならびにアポトーシス阻害剤Ｂｃｌ－２の下方調節、および／またはアポトーシス促進因子カスパーゼ－３の上方調節をもたらすことを実証する。特定の前駆体またはそれらの組み合わせは、細胞増殖もまた阻害し得る。データは、Ｃ

ｏＱ１０投与と実質的に同じ結果を達成するために、ＣｏＱ１０前駆体がＣｏＱ１０の代わりに使用されてもよいことを示唆する。

【０５５１】

実験において使用された特定の例示的な実験条件は以下に列挙される。

【０５５２】

Ｓｋｍｅｌ－２８黒色腫細胞は、５％　ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）および１×最終濃度の抗生物質を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で培養された。細胞は、８５％コンフルエンシーまで増殖され、３、６、１２、および２４時間の間、ビルディングブロック成分で処置された。次いで、細胞はペレット化され、ウェスタンブロット分析が実施された。

【０５５３】

試験ビルディングブロック成分は、Ｌ－フェニルアラニン、ＤＬ－フェニルアラニン、Ｄ－フェニルアラニン、Ｌ－チロシン、ＤＬ－チロシン、Ｄ－チロシン、４－ヒドロキシ－フェニルピルビン酸、フェニル酢酸、３－メトキシ４－ヒドロキシマンデル酸（バニリルマンデル酸またはＶＭＡ）、バニリン酸、４－ヒドロキシ－ベンゾエート、ピリドキシン、パンテノール、メバロン酸、アセチルグリシン、アセチル－ＣｏＡ、ファルネシル、および２，３－ジメトキシ－５－メチル－ｐ－ベンゾキノンを含んだ。

【０５５４】

ウェスタンブロット分析において、細胞は冷ＰＢＳ中でペレット化され、溶解され、そしてタンパク質レベルはＢＣＡタンパク質アッセイを使用して定量された。全細胞溶解物は、４％ローディング１２％泳動Ｔｒｉｓ－ＨＣｌゲルにロードされた。次いで、タンパク質はニトロセルロースペーパーに転写され、次いで、５％　ミルクＴｒｉｓ緩衝液で１時間ブロックされた。次いで、タンパク質は、一次抗体（Ｂｃｌ－２およびカスパーゼ－３）に一晩曝露された。次いで、ニトロセルロースペーパーは、Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔに５分間曝露され、タンパク質発現が記録された。曝露後、アクチンが同じ方法を使用して定量された。ＩｍａｇｅＪを使用して、タンパク質発現のレベルが定量された。ｔ検定が使用されて統計学的有意さについて分析した。

【０５５５】

実験の例証的な結果は以下に要約される。

【０５５６】

ビルディングブロック成分Ｌ－フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：キノン環構造についての合成経路に着手する前に、Ｌ－フェニルアラニンがチロシンに転換される。ウェスタンブロット分析は、黒色腫細胞におけるアポトーシスタンパク質の発現の任意の変化を定量するように実施された。試験された濃度は５μＭ、２５μＭ、および１００μＭであった。初期の研究は、０．４Ｍの濃度のフェニルアラニンを含んだＤＭＥＭ／Ｆ１２培地にＬ－フェニルアラニンを加えた。５μＭ、２５μＭ、および１００μＭについては、培地中のＬ－フェニルアラニンの最終濃度は、それぞれ、０．４０５Ｍ、０．４２５Ｍ、および０．５００Ｍであった。これらの最終濃度は、３、６、１２、および２４時間のインキュベーション時間の間、Ｓｋｍｅｌ－２８細胞に対して試験された。細胞は、８０％コンフルエンシーまで増殖され、その後、処置培地を加え、上記のようにウェスタンブロット分析手順を使用して収穫された。統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少は、３時間および１２時間のインキュベーション後に、１００μＭ　Ｌ－フェニルアラニンについて観察された。５μＭ　Ｌ－フェニルアラニンについては、統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少は、インキュベーションの６時間後に観察された。２５μＭ　Ｌ－フェニルアラニンについては、統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少、および統計学的に有意なカスパーゼ－３の増加が１２時間のインキュベーション後に観察された。統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少は、アポトーシス能力の変化を示し、統計学的に有意なカスパーゼ－３の増加は細胞がアポトーシスを受けていることを確認する。たとえ試料サイズおよび標準偏差に起因して、この実験においてこれらの時点は統計学的に有意ではないとしても、対照と比較してＢｃｌ－２の減少の一定の傾向が存在した。

【０５５７】

ビルディングブロック成分Ｄ－フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：生物活性Ｌ－フェニルアラニンの化学合成型であるＤ－フェニルアラニンは、Ｌ－フェニルアラニンに対する比較のために試験された。３つすべての濃度について（５μＭ、２５μＭ、および１００μＭのＤ－フェニルアラニン）、インキュベーションの６時間後にＢｃｌ－２発現の有意な減少が存在した。加えて、５μＭおよび２５μＭについては、インキュベーションの３時間後に有意な減少が存在した。５μＭおよび１００μＭ濃度については、カスパーゼ－３発現の有意な増加が、６時間のインキュベーション後に観察された。

【０５５８】

ビルディングブロック成分ＤＬ－フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：ＤＬ－フェニルアラニンもまた、Ｌ－フェニルアラニンとの比較のために試験された。再度、５μＭ、２５μＭ、および１００μＭの濃度がＳｋｍｅｌ－２８細胞に対して試験された。インキュベーション時間は、３、６、１２、および２４時間であった。統計学的に有意なカスパーゼ－３の増加が３時間のインキュベーション後に観察された。統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少が２４時間のインキュベーション後に観察された。Ｂｃｌ－２の減少およびカスパーゼ－３の増加の傾向が、すべての他の濃度およびインキュベーション時点であるが、これらは、この実験においては統計学的に有意ではなかった。

【０５５９】

ビルディングブロック成分Ｌ－チロシンのウェスタンブロット分析：Ｌ－チロシンはＣｏＱ１０のキノン環構造の合成のためのビルディングブロック成分である。Ｌ－チロシンの初期の試験は、ウェスタンブロット分析のために十分に高いタンパク質濃度を生じなかった。この研究から２５μＭより下の濃度がウェスタンブロット分析のために試験された。使用されたＤＭＥＭ／Ｆ１２培地は、０．３９８４６７ＭのＬ－チロシン二ナトリウム塩を含んだ。初期濃度は５００ｎＭ、５μＭ、および１５μＭ増加された。統計学的に有意なカスパーゼ－３の増加は、１２時間のインキュベーション後に５００ｎＭ濃度について観察された。統計学的に有意なカスパーゼ－３の増加もまた、５Ａについて観察され、統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少は、２４時間のインキュベーション後に５μＭ濃度について観察された。統計学的に有意なＢｃｌ－２の減少は、２４時間のインキュベーション後に５００μＭおよび５μＭ濃度について観察された。

【０５６０】

ビルディングブロック成分Ｄ－チロシンのウェスタンブロット分析：Ｌ－チロシンの合成型であるＤ－チロシンは、黒色腫（ｍｅｌａｎｏｎａｌ）細胞に対するＬ－チロシンのアポトーシス性効果に対しての比較のために試験された。Ｌ－チロシンを用いる初期の研究に基づいて、ウェスタンブロット分析のために２５μＭより下の濃度が選ばれた。試験された濃度は１μＭ、５μＭ、および１５μＭであった。Ｄ－チロシンは、１２および２４時間の期間の間、５μＭおよび１５μＭ濃度についてＢｃｌ－２発現の減少を示した。カスパーゼ－３は、３、１２、および２４時間の期間で、５μＭ濃度について有意に増加された。１２および２４時間の期間で、１μＭについてカスパーゼ－３発現の増加もまた存在した。加えて、１２時間の期間で、５μＭについてカスパーゼ－３発現の増加が存在する。

【０５６１】

ビルディングブロック成分ＤＬ－チロシンのウェスタンブロット分析：Ｌ－チロシンの合成型であるＤＬ－チロシンもまた、細胞に対するＬ－チロシンのアポトーシス効果に対する比較のために試験された。１２時間のインキュベーション後に１μＭおよび１５μＭ濃度において、ならびに２４時間のインキュベーション後に５μＭについて見られたＢｃｌ－２発現の統計学的な減少が存在する。カスパーゼ－３発現の増加もまた、１２時間のインキュベーション後に５μＭおよび１５μＭについて観察された。

【０５６２】

ビルディングブロック成分４－ヒドロキシ－フェニルピルビン酸のウェスタンブロット分析：４－ヒドロキシ－フェニルピルビン酸は、アミノ酸であるチロシンおよびフェニルアラニンから誘導され、環構造の合成において役割を果たす可能性がある。１μＭ、５μ

Ｍ、および１５μＭの濃度がＢｃｌ－２およびカスパーゼ－３発現のために試験された。５μＭおよび１５μＭ濃度について、２４時間のインキュベーション後にＢｃｌ－２発現の有意な減少が存在し、１２時間のインキュベーション後にカスパーゼ－３発現の有意な増加が存在した。

【０５６３】

ビルディングブロック成分フェニル酢酸のウェスタンブロット分析：フェニル酢酸は、４－ヒドロキシ－ベンゾエートに転換される能力を有し、これは、環構造への側鎖の結合において役割を果たす。試験された濃度は、１μＭ、５μＭ、および１５μＭであった。フェニル酢酸については、１２時間および２４時間のインキュベーション後に５μＭおよび１５μＭの濃度についてＢｃｌ－２発現の減少が存在した。カスパーゼ－３発現の増加は、１２時間および２４時間のインキュベーション後に５μＭおよび１５μＭの濃度について観察された。

【０５６４】

ビルディングブロック成分３－メトキシ４－ヒドロキシマンデル酸（バニリルマンデル酸またはＶＭＡ）のウェスタンブロット分析：ＶＭＡは、ＣｏＱ１０キノン環構造の合成のためのさらなる成分である。試験された濃度は１００ｎＭ、２５０ｎＭ、５００ｎＭ、１μＭ、２５μＭ、５０μＭ、および１００μＭであった。統計学的に有意なアポトーシス効果はこの実験において観察されなかったが、データはＢｃｌ－２発現の下向きの傾向を示した。

【０５６５】

ビルディングブロック成分バニリン酸のウェスタンブロット分析：バニリン酸（Ｖａｎｉｌｌｉｃ）はキノン環の合成のための前駆体であり、５００ｎｍ、５μＭ、および１５μＭの濃度で試験された。ウェスタンブロット分析は、Ｂｃｌ－２およびカスパーゼ－３発現を測定した。バニリン酸は２４時間インキュベーション時点での５００ｎＭおよび５μＭの濃度についてＢｃｌ－２発現を有意に減少することが示された。１５μＭ濃度について、３時間のインキュベーション後にＢｃｌ－２発現の減少が存在した。２４時間、１５μＭとともにインキュベートした細胞において、カスパーゼ－３発現の有意な増加が存在した。

【０５６６】

ビルディングブロック成分４－ヒドロキシベンゾエートのウェスタンブロット分析：４－ヒドロキシベンゾエートは、環構造へのイソプレノイド側鎖の結合において役割を果たす。試験された濃度は、５００ｎＭ、１μＭ、および５０μＭであった。２４時間のインキュベーション後、１５μＭ濃度でＢｃｌ－２発現の有意な減少が存在した。

【０５６７】

ビルディングブロック成分４－ピリドキシンのウェスタンブロット分析：ピリドキシンはＣｏＱ１０のキノン環構造の合成のための別の前駆体ビルディングブロックである。この化合物のために試験された濃度は、５μＭ、２５μＭ、および１００μＭである。細胞はＢｃｌ－２およびカスパーゼ－３のそれらのレベルについてアッセイされた。ピリドキシンは黒色腫細胞中での２４時間のインキュベーション後にＢｃｌ－２の有意な減少を示した。

【０５６８】

ビルディングブロック成分パンテノールのウェスタンブロット分析：パンテノールはＣｏＱ１０のキノン環構造の合成のおいて役割を果たす。黒色腫細胞に対して試験された濃度は５μＭ、２５μＭ、および１００μＭである。この化合物は、２５μＭ濃度についてＢｃｌ－２発現の有意な減少を示した。

【０５６９】

ビルディングブロック成分メバロン酸（Ｍｅｖａｌｏｎｉｃ）のウェスタンブロット分析：メバロン酸はＣｏＱ１０の合成のための主要な成分の１つである。この化合物は、５００ｎＭ、１μＭ、２５μＭ、および５０μＭの濃度で試験された。この実験において、Ｂｃｌ－２発現の有意な減少またはカスパーゼ－３発現の有意な増加は存在しなかった。

【０５７０】
ビルディングブロック成分アセチルグリシンのウェスタンブロット分析：ＣｏＱ１０の合成のための別の経路は、イソプレノイド（側鎖）合成である。アセチルグリシンの付加は、コエンザイムＡをアセチル－ＣｏＡに転換し、これは、イソプレノイド合成のためのメバロン酸経路に入る。試験された濃度は５μＭ、２５μＭ、および１００μＭであった。アセチルグリシンの試験は、５μＭおよび２５μＭの濃度についての１２時間のインキュベーション後にＢｃｌ－２発現の有意な減少を示した。Ｂｃｌ－２の有意な減少は、２４時間インキュベーションの時点で１００μＭ濃度について記録された。

【０５７１】
ビルディングブロック成分アセチル－ＣｏＡのウェスタンブロット分析：アセチル－ＣｏＡはＣｏＱ１０の合成のためのメバロン酸経路のための前駆体である。試験された濃度は５００ｎｍ、１μＭ、２５μＭ、および５０μＭであった。試験された時点および濃度について、Ｂｃｌ－２発現の有意な減少またはカスパーゼ－３発現の有意な増加は観察されなかった。

【０５７２】
ファルネシルと組み合わせたビルディングブロック成分Ｌ－チロシンのウェスタンブロット分析：Ｌ－チロシンは、ＣｏＱ１０のキノン環構造の合成のための前駆体の１つである。以前の実験は、Ｌ－フェニルアラニンおよびＬ－チロシンとの、培地中のＬ－チロシンの反応を試験した。本研究において、Ｌ－チロシンは、Ｌ－フェニルアラニンおよびＬ－チロシンの添加なしの培地中で試験された。本研究において、試験されたＬ－チロシンの最終濃度は、５００ｎＭ、５μＭ、および１５μＭであった。ファルネシルは、５０μＭの濃度で試験された。３時間および６時間の時点について、有意な応答は観察されなかった。

【０５７３】
ファルネシルと組み合わせたビルディングブロック成分Ｌ－フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：キノン環構造の合成のための前駆体であるＬ－フェニルアラニンは、Ｌ－チロシンおよびＬ－フェニルアラニンを含まない培地中でファルネシルと組み合わせて試験された。ウェスタンブロット分析は、Ｂｃｌ－２およびカスパーゼ－３の発現をアッセイするために実施された。Ｌ－フェニルアラニンの最終濃度は、５μＭ、２５μＭ、および１００μＭであった。ファルネシルは５０μＭの濃度で加えられた。本研究は、以下の表５５において示されたように試験された濃度および組み合わせの多くについてのＢｃｌ－２発現の減少を示した。

【表５５】

表５５

Ｌ－フェニルアラニン	３時間		６時間		１２時間		２４時間	
	Ｂｃｌ－２	Ｃａｓ－３	Ｂｃｌ－２	Ｃａｓ－３	Ｂｃｌ－２	Ｃａｓ－３	Ｂｃｌ－２	Ｃａｓ－３
５μＭ	Ｘ							
５μＭ　ｗ／ファルネシル							Ｘ	Ｘ
２５μＭ	Ｘ		Ｘ					
２５μＭ　ｗ／ファルネシル	Ｘ							Ｘ
１００μＭ	Ｘ		Ｘ				Ｘ	
１００μＭ　ｗ／ファルネシル				Ｘ				

【０５７４】
４－ヒドロキシ－ベンゾエートのベンゾキノンとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：この実験のセットは、細胞増殖に対する異なるビルディングブロック分子を組み合わせることの効果を評価するための細胞増殖アッセイを使用した。

【０５７５】

試験された最初の研究は、４－ヒドロキシ－ベンゾエートをベンゾキノンと組み合わせる効果を試験した。細胞は４８時間インキュベートされ、その後、細胞の計数が生細胞について実施された。各試験群は対照と比較され、各組み合わせ群はベンゾキノン対照と比較された。化合物はベンゾキノンの付加のために統計学的に分析された。以下の表は細胞計数結果を要約し、ここで、Ｘ印は細胞数の統計学的な減少を示す。

【表５６】

表５６

４－ヒドロキシ	対照との比較	４－ヒドロキシ対ベンゾキノンなし化合物との比較	ベンゾキノン対照との比較
５００ｎｍ	Ｘ		
５００ｎｍ ｗ／Ｂｅｎｚｏ（３５μＭ）	Ｘ	Ｘ	
５００ｎｍ ｗ／Ｂｅｎｚｏ（７０μＭ）	Ｘ	Ｘ	
１μＭ	Ｘ		
１μｍ ｗ／Ｂｅｎｚｏ（３５μＭ）	Ｘ	Ｘ	
１μｍ ｗ／Ｂｅｎｚｏ（７０μＭ）	Ｘ	Ｘ	
５０μＭ【０００１】	Ｘ		
５０μｍ ｗ／Ｂｅｎｚｏ（３５μＭ）	Ｘ		
５０μｍ ｗ／Ｂｅｎｚｏ（７０μＭ）	Ｘ	Ｘ	Ｘ

【０５７６】

４－ヒドロキシベンゾエート（４－ｈｙｄｒｏｘｙｂｅｎｚｏｉｃ）およびベンゾキノンおよび組み合わせとともにインキュベートされた細胞の細胞数の有意な減少が存在した。７０μＭ ベンゾキノンと組み合わせた５０μＭ ４－ヒドロキシベンゾエートの組み合わせについて、ベンゾキノン対照と比較して細胞数の有意な減少が存在した。これは、このモル比についての相乗効果を示唆する。

【０５７７】

さらなるモル比を試験するさらなる研究が実施された。最初の試験において、４－ヒドロキシベンゾエート（４－ｈｙｄｒｏｘｙｂｅｎｚｏｉｃ）は、５００ｎＭ、１μＭ、および５０μＭの濃度で試験された。これらの濃度は、２，３－ジメトキシ－５－メチル－ｐ－ベンゾキノン（Ｂｅｎｚｏ）との組み合わせで試験された。試験されたＢｅｎｚｏの濃度は２５μＭ、５０μＭ、および１００μＭであった。黒色腫細胞は８０％コンフルエンシーまで増殖され、ウェルあたり４０Ｋ細胞の濃度で、６ウェルプレートに播種された。細胞は、ＣｏＱ１０、４－ヒドロキシベンゾエート、Ｂｅｎｚｏ、および４－ヒドロキシベンゾエート／Ｂｅｎｚｏの組み合わせで処置された。

【０５７８】

Ｔ－検定が、ｐ＜０．０５を統計学的に有意であるとして実施された。Ｘは細胞数の統計学的減少を意味する。

【表５７】

表５７

対照対Ｂｅｎｚｏ　２５μＭ	Ｘ
対照対Ｂｅｎｚｏ　（Ｂ）　５０μＭ	
対照対Ｂｅｎｚｏ　（Ｂ）　１００μＭ	Ｘ
対照対４－ヒドロキシベンゾエート　（ＨＢ）　５００ｎｍ	Ｘ
対照対ＨＢ　１μＭ	Ｘ
対照対ＨＢ　５０μＭ	Ｘ
５００ｎＭ　ＨＢ対５００ｎＭ　ＨＢ　ｗ／２５Ｂ	Ｘ
５００ｎＭ　ＨＢ対５００ｎＭ　ＨＢ　ｗ／５０Ｂ	Ｘ
５００ｎＭ　ＨＢ対５００ｎＭ　ＨＢ　ｗ／１００Ｂ	Ｘ
１μＭ　ＨＢ対１μＭ　ＨＢ　ｗ／２５Ｂ	Ｘ
１μＭ　ＨＢ対１μＭ　ＨＢ　ｗ／５０Ｂ	Ｘ
１μＭ　ＨＢ対１μＭ　ＨＢ　ｗ／１００Ｂ	
５０μＭ　ＨＢ対５０μＭ　ＨＢ　ｗ／２５Ｂ	Ｘ
５０μＭ　ＨＢ対５０μＭ　ＨＢ　ｗ／５０Ｂ	Ｘ
５０μＭ　ＨＢ対５０μＭ　ＨＢ　ｗ／１００Ｂ	
５００ｎＭ　ＨＢ　ｗ／２５Ｂ対２５Ｂ	Ｘ
５００ｎＭ　ＨＢ　ｗ／５０Ｂ対５０Ｂ	Ｘ
５００ｎＭ　ＨＢ　ｗ／１００Ｂ対１００Ｂ	Ｘ
１μＭ　ＨＢ　ｗ／２５Ｂ対２５Ｂ	Ｘ
１μＭ　ＨＢ　ｗ／５０Ｂ対５０Ｂ	Ｘ
１μＭ　ＨＢ　ｗ／１００Ｂ対１００Ｂ	
５０μＭ　ＨＢ　ｗ／２５Ｂ対２５Ｂ	Ｘ
５０μＭ　ＨＢ　ｗ／５０Ｂ対５０Ｂ	Ｘ
５０μＭ　ＨＢ　ｗ／１００Ｂ対１００Ｂ	

【０５７９】

ＨＢを含有する処置培地について細胞増殖の有意な減少が存在する。さらに、ベンゾキノンとのＨＢの組み合わせは、対応するベンゾキノン濃度とともにインキュベートされた細胞と比較して、細胞数の有意な減少を示した。

【０５８０】

細胞増殖アッセイもまた、新生児線維芽細胞に対して実施された。試験されたＨＢの濃度は、５００ｎＭ、５μＭ、および２５μＭであった。ＨＢはまた、２５μＭ、５０μＭ、および１００μＭの濃度でベンゾキノンと組み合わせて試験された。黒色腫細胞は、ウェルあたり４０ｋ細胞で播種され、２４時間の間処置された。細胞はトリプシン処理され、コールターカウンターを使用して定量された。

【０５８１】

統計学的分析は、線維芽細胞の有意な減少を示さなかった。このことは、正常細胞における毒性は、最小限から全くないまでであることを示す。

【０５８２】

フェニル酢酸とベンゾキノンの組み合わせの細胞増殖アッセイ：フェニル酢酸は、４－ヒドロキシ安息香酸（環構造の結合を容易にする）の合成の前駆体である。細胞増殖アッセイが、ＣｏＱ１０およびベンゾキノンと組み合わせてフェニル酢酸をインキュベートすることの効果をアッセイするために実施された。

【表５８】

表５８

対照および２５／２５μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
対照および２５／５０μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
対照および２５／１００μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
対照および２５／２５μＭ Ｑ－１０	Ｘ
対照および２５／２５μＭ Ｑ－１０	Ｘ
対照および２５／５０μＭ Ｑ－１０	Ｘ
対照および２５／１００μＭ Ｑ－１０	Ｘ
対照およびＢｅｎ ２５	Ｘ
対照およびＢｅｎ ５０	Ｘ
対照およびＢｅｎ １００	Ｘ
対照およびＱ－１０ ２５	
対照およびＱ－１０ ５０	
対照およびＱ－１０ １００	Ｘ
Ｂｅｎ ２５μＭ および５００ｎＭ／２５μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
Ｂｅｎ ２５μＭ および５ｎＭ／２５μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
Ｂｅｎ ２５μＭ および２５ｎＭ／２５μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
Ｂｅｎ ５０μＭ および５００ｎＭ／５０μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
Ｂｅｎ ５０μＭ および５ｎＭ／５０μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
Ｂｅｎ ５０μＭ および２５ｎＭ／５０μＭ Ｂｅｎ	Ｘ
Ｂｅｎ １００μＭ および５００ｎＭ／１００μＭ Ｂｅｎ	
Ｂｅｎ １００μＭ および５ｎＭ／１００μＭ Ｂｅｎ	
Ｂｅｎ １００μＭ および２５ｎＭ／１００μＭ Ｂｅｎ	
Ｑ－１０ ２５μＭ および５００ｎＭ／２５μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ ２５μＭ および５ｎＭ／２５μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ ２５μＭ および２５ｎＭ／２５μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ ５０μＭ および５００ｎＭ／５０μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ ５０μＭ および５ｎＭ／５０μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ ５０μＭ および２５ｎＭ／５０μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ １００μＭ および５００ｎＭ／１００μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ １００μＭ および５ｎＭ／１００μＭ Ｑ－１０	Ｘ
Ｑ－１０ １００μＭ および２５ｎＭ／１００μＭ Ｑ－１０	Ｘ

【０５８３】

データは、ベンゾキノンと組み合わせたフェニル酢酸の付加が、細胞増殖を有意に減少したことを示す。ＣｏＱ１０とフェニル酢酸の組み合わせは、ＣｏＱ１０およびベンゾキノンの単独とのインキュベーションと比較して、細胞数を有意に減少する。

【０５８４】

４－ヒドロキシ－ベンゾエートのファルネシルとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：４－ヒドロキシ－ベンゾエートは、ファルネシルと組み合わせてインキュベートされた。結果の要約は以下に列挙される。４－ヒドロキシベンゾエートグループは対照およびファルネシル対照グループと比較された。Ｘは細胞数の統計学的減少を意味する。

【表５９】

表５９

４－ヒドロキシ－ベンゾエート	対照との比較	４－ヒドロキシ対ファルネシルなし化合物との比較	ファルネシル対照との比較
５００ｎｍ	X		
５００ｎｍ　ｗ／　ファルネシル（３５μＭ）	X		
５００ｎｍ　ｗ／　ファルネシル（７０μＭ）	X		
１μＭ	エラー		
１μＭ　ｗ／　ファルネシル（３５μＭ）	エラー		
１μＭ　ｗ／　ファルネシル（７０μＭ）	エラー		
５０μＭ	X		
５０μＭ　ｗ／　ファルネシル（３５μＭ）	X		
５０μＭ　ｗ／　ファルネシル（７０μＭ）	X		

【０５８５】

Ｌ－フェニルアラニンのベンゾキノンとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：細胞増殖アッセイは、ベンゾキノンと組み合わせたＬ－フェニルアラニンの組み合わせを試験するために実施された。以下は、対照およびベンゾキノン対照と比較されたＬ－フェニルアラニンの結果の要約である。Ｘは統計学的な減少を意味する。

【表６０】

表６０

Ｌ－フェニルアラニン	対照との比較	Ｌ－フェニルアラニン対ベンゾキノンなし化合物との比較	ベンゾキノン対照との比較
５μＭ			
５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（５０μＭ）		X	
５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（１００μＭ）		X	
２５μＭ			
２５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（５０μＭ）		X	
２５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（１００μＭ）		X	
１００μＭ			
１００μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（５０μＭ）	X	X	X
１００μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（１００μＭ）	X	X	X

【０５８６】

同様の相乗作用的役割は、ベンゾキノンと組み合わせたＬ－フェニルアラニンについて見られる。

【０５８７】

Ｌ－フェニルアラニンのファルネシルとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：ファルネシルと組み合わせてインキュベートされたＬ－フェニルアラニンの組み合わせ細胞増殖研究の予備的結果。Ｌ－フェニルアラニンは、対照およびファルネシル対照グループに対して比較された。Ｘは細胞数の統計学的減少を意味する。

【表６１】

表６１

Ｌ－フェニルアラニン	対照との比較	Ｌ－フェニルアラニン対ファルネシルなしの化合物との比較	ファルネシル対照との比較
５μＭ			
５μＭ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）			
５μＭ　ｗ／　ファルネシル（１００μＭ）			
２５μＭ	Ｘ		
２５μＭ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）	Ｘ	Ｘ	Ｘ
２５μＭ　ｗ／　ファルネシル（１００μＭ）	Ｘ	Ｘ	Ｘ
１００μＭ	Ｘ		
１００μＭ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）	Ｘ		Ｘ
１００μＭ　ｗ／　ファルネシル（１００μＭ）	Ｘ		

【０５８８】

Ｌ－チロシンのベンゾキノンとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：Ｌ－チロシンはベンゾキノンと組み合わせてインキュベートされ、その後、細胞計数が実施された。グループは、対照グループおよびベンゾキノン対照グループと比較された。

【表６２】

表６２

Ｌ－チロシン	対照との比較	Ｌ－チロシン対ベンゾキノンなしの化合物との比較	ベンゾキノン対照との比較
５００ｎｍ			
５００ｎｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（５０μＭ）			
５００ｎｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（１００μＭ）			
５μＭ	Ｘ		
５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（５０μＭ）	Ｘ		
５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（１００μＭ）	Ｘ		
１５μＭ	Ｘ		
１５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（５０μＭ）	Ｘ		
１５μｍ　ｗ／　Ｂｅｎｚｏ（１００μＭ）	ｘ		

【０５８９】

ベンゾキノンの付加は、細胞数に対するＬ－チロシンの効果を増幅しなかった。

【０５９０】

Ｌ－チロシンのベンゾキノンとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：本研究は、Ｌ－チロシンのファルネシルとの組み合わせを試験した。グループは対照およびファルネシル対照グループと比較された。

【表６３】

表６３

Ｌ－チロシン	対照との比較	Ｌ－チロシン対ファルネシルなしの化合物との比較	ファルネシル対照との比較
５００ｎｍ			
５００ｎｍ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）			
５００ｎｍ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）			
５μＭ	Ｘ		
５μＭ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）	Ｘ		
５μＭ　ｗ／　ファルネシル（１００μＭ）	Ｘ		
１５μＭ	Ｘ		
１５μＭ　ｗ／　ファルネシル（５０μＭ）	Ｘ		
１５μＭ　ｗ／　ファルネシル（１００μＭ）	Ｘ		

【０５９１】

Ｌ－チロシンおよびファルネシルを組み合わせることは、この実験において細胞数を減少させることに対して相乗作用を有するようには見えない。

【０５９２】

ＣｏＱ１０の合成は２つの主要部分に分けられ、これは、環構造の合成および側鎖構造の合成からなる。ここで、発癌性細胞は、側鎖および環構造の構成要素の合成のための前駆体である化合物が補充された。本発明者らの結果は、環構造、および側鎖構造への環構造の結合において役割を果たす２つの化合物の合成に関与する３つの主要な構成要素に研究の焦点を当ててきた。Ｂｃｌ－２の有意な減少を示し、カスパーゼ－３発現を増加するこれら３つの化合物は、１）Ｌ－フェニルアラニン、２）Ｌ－チロシン、および３）４－ヒドロキシフェニルピルビン酸である。側鎖の環構造への結合に関与する２つの化合物は、１）４－ヒドロキシベンゾエートおよび２）フェニル酢酸である。

【０５９３】

本発明者らの結果はまた、２，３　ジメトキシ５－メチル－ｐ－ベンゾキノン（ベンゾキノン）と組み合わせたこれらの化合物の外因性送達が、細胞増殖を有意に阻害することを示した。このことは、ベンゾキノン環への側鎖の結合のための化合物での環構造の補充は、損なわれたＣｏＱ１０合成メカニズムを補充し得ることを示す。このことはまた、細胞プロセスによって必要とされる機能的特性を維持するために分子の安定化を補助し得る。フェニル酢酸は、４－ヒドロキシベンゾエートの合成のための前駆体であり、ベンゾキノンと組み合わせたこの外因性送達は、発癌性細胞において同様の効果を有する。

【０５９４】

実施例２４：糖尿病の細胞モデルにおけるコエンザイムＱ１０による遺伝子発現の調節

コエンザイムＱ１０は、酸化的リン酸化に直接的に影響を与えることによって正常なミトコンドリア機能の維持において確立された役割を有する内因性分子である。糖尿病などの代謝性障害の重要な指標として治療の終点を示す様式で働く細胞内標的を調節する際のコエンザイムＱ１０の能力を実証する実験的な証拠が提示されている。

【０５９５】

糖尿病の原因または処置に関連する遺伝子の発現をコエンザイムＱ１０がいかにして調節するかを理解するために、ヒト腎臓由来の不死化初代腎臓近位尿細管細胞系統（ＨＫ－２）およびヒト大動脈平滑筋細胞（ＨＡＳＭＣ）の初代培養が実験モデルとして使用された。ＨＫ－２およびＨＡＳＭＣ細胞は、５．５ｍＭ　グルコースで培養中に正常に維持され、これは、ヒト血液中で正常と見なされる範囲に対応する濃度である。しかし、糖尿病

環境を刺激するために、両方の細胞系統は、続いて、２２ｍＭ　グルコースに維持され、これは、慢性高血糖に関連するヒト血液中で観察される範囲に対応する。続いて、細胞内調節プロセスが糖尿病状態を模倣するように機能的に適合されるように、細胞は３継代にわたり増殖させた。細胞系統の選択は、損なわれた心臓血管機能の進行性の病態生理学に加えて、腎機能不全および末期の腎臓病（ＥＳＲＤ）への進行に対する糖尿病の生理学的影響に基づいた。

【０５９６】

糖尿病ＰＣＲアレイを使用するＨＫ－２細胞における遺伝子発現に対するコエンザイムＱ１０の効果

糖尿病ＰＣＲアレイ（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、同時に８４種の遺伝子のスクリーニングを提供する。本研究において試験された４種の処置は以下の通りである。

【０５９７】

・ＨＫ－２；
・ＨＫ－２　Ｈ維持された２２ｍＭ　グルコース；
・ＨＫ２（Ｈ）＋５０μＭ　コエンザイムＱ１０；および
・ＨＫ２（Ｈ）＋１００μＭ　コエンザイムＱ１０。

【０５９８】

糖尿病アレイ（カタログ番号ＰＡＨＳ－０２３Ｅ，ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＤ）に対する　ＨＫ－２試料のリアルタイムＰＣＲデータのストリンジェント分析は、遺伝子調節がＨＫ－２正常未処置細胞よりも少なくとも２倍の調節ではなく、０．０５未満のｐ値であるすべての結果を排除するように行われた。慢性高血糖またはコエンザイムＱ１０のいずれかによって調節されることが観察された遺伝子が表６４に列挙され、それらの機能および細胞下局在（Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ　Ｐａｔｈｗａｙ　Ａｎａｌｙｓｉｓ由来）は表６５に列挙される。

【表６４】

表６４

遺伝子	HK－２（H）倍調節	ｐ値	HK－２（H）－５０μＭ　コエンザイムＱ１０　倍調節	ｐ値	HK－２（H）－１００μＭ　コエンザイムＱ１０倍調節	ｐ値
CEACAM1	１．２６	０．４０９	３．４７	０．０６７	５．３６	０．０３２
PIK3C2B	１．４８	０．１３１	２．３２	０．１１５	３．３１	０．００３
INSR	－１．０９	０．５６８	２．５１	０．１０３	２．８８	０．０２４
TNF	２．００	０．００５	２．５７	０．０４２	２．８１	０．０２０
ENPP1	－１．５０	０．００２	１．４２	０．２３８	２．６７	０．０３８
PRKCB	－１．７５	０．００５	１．８２	０．２８０	２．４９	０．０４２
DUSP4	１．２７	０．３１８	１．２４	０．４５５	２．２６	０．０６０
SELL	－１．５８	０．２１９	１．７７	０．０４２	２．０６	０．０２１
SNAP25	－１．００	０．９３４	１．４６	０．３７７	１．９７	０．０５９

【表６５】

表６５

記号	Ｅｎｔｒｅｚ　遺伝子名	局在	タイプ
ＣＥＡＣＡＭ１	癌胎児性抗原関連細胞接着分子１　（胆汁糖タンパク質）	原形質膜	膜貫通受容体
ＰＩＫ３Ｃ２Ｂ	ホスホイノシチド－３－キナーゼ、クラス２、ベータポリペプチド	細胞質	キナーゼ
ＩＮＳＲ	インスリン受容体	原形質膜	キナーゼ
ＴＮＦ	腫瘍壊死因子　（ＴＮＦ　スーパーファミリー、メンバー２）	細胞外空間	サイトカイン
ＥＮＰＰ１	エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ　１	原形質膜	酵素
ＰＲＫＣＢ	プロテインキナーゼＣ、ベータ	細胞質	キナーゼ
ＤＵＳＰ４	二重特異性ホスファターゼ　４	核	ホスファターゼ
ＳＥＬＬ	セレクチン　Ｌ	原形質膜	その他
ＳＮＡＰ２５	シナプトソーム関連タンパク質、２５ｋＤａ	原形質膜	トランスポーター

【０５９９】

調節されたレベルを用いて検出されたＲＮＡ転写物の中で、癌胎児性抗原関連細胞接着分子１（ＣＥＡＣＡＭ１）が、特に、１００μＭ　コエンザイムＱ１０処置を用いて、ＨＫ２（Ｈ）細胞において高度に上方調節されているとして同定された。ＣＤ６６ａおよびＢＧＰ－Ｉとしてもまた知られているＣＥＡＣＡＭ－１は、ＣＥＡスーパーファミリーの膜結合ＣＥＡサブファミリーに属する、１１５－２００　ＫＤ　Ｉ型膜貫通糖タンパク質である。細胞の表面上で、これは非共有結合性のホモ－およびヘテロダイマーを形成する。細胞外領域は、３つのＣ２型Ｉｇ様ドメインおよび１つのＮ末端Ｖ型Ｉｇ様ドメインを含む。Ｃ末端から第２のＣ２型ドメイン（ａａ　３２０およびその向こう）を含む複数のスプライシング変異体が存在する。インタクトなマウスにおけるＣＥＡＣＡＭ１発現の欠如は、糖尿病に関連する代謝症候群を促進することが提案されているのに対して、ＣＥＡＣＡＭ１発現の増加はインスリンの内部化と関連し、これは、インスリン感受性の増加およびグルコースの利用（例えば、血液から細胞へのグルコースの移動）を示唆し、したがって、２型糖尿病に特徴的な特質であるインスリン抵抗性を軽減する。

【０６００】

表５５に示されるように、インスリン受容体（ＩＮＳＲ）発現もまた、コエンザイムＱ１０で処置された糖尿病性ＨＫ－２細胞中で変化された。理論によって束縛されることは望まないが、コエンザイムＱ１０処置に伴うＩＮＳＲの発現の増加は、インスリン感受性を増強し（単独でまたはＣＥＡＣＡＭ１の発現に加えてのいずれかで）、糖尿病に関連する主要な生理学的／代謝的合併症を逆転する潜在能力を有する。

【０６０１】

ミトコンドリアアレイを使用するＨＫ－２細胞における遺伝子発現に対するコエンザイムＱ１０の効果

糖尿病におけるミトコンドリア遺伝子の示差的な発現は、ミトコンドリアアレイ（カタログ番号ＰＡＨＳ　０８７Ｅ、ＳＡＢｉｓｏｃｉｅｎｃｅｓ　Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＤ）を使用してアッセイされた。慢性高血糖および／またはコエンザイムＱ１０処置によって調節された遺伝子は表６６に列挙され、一方それらの機能は表６７に含まれる。

【表６６】

表６６

遺伝子	HK2 (H) 未処置	p値	HK－2 (H) 50μM コエンザイムQ10	p値	HK－2 (H) 100μM コエンザイムQ10	p値
GRPEL1	－1．5837	0．151255	－2．6512	0．04704	－1．933	0．139161
SLC25A3	－8．6338	0．071951	－8．2059	0．0425	－1．6984	0．995194
TOMM40	－2．3134	0．140033	－1．1567	0．115407	－1．9509	0．038762
TSPO	－3．6385	0．111056	－6．7583	0．073769	－2．1104	0．167084

【表６７】

表６７

記号	Ｅｎｔｒｅｚ 遺伝子名	局在	タイプ
ＧＲＰＥＬ１	ＧｒｐＥ－様１、ミトコンドリア（Ｅ．ｃｏｌｉ）	ミトコンドリア	その他
ＳＬＣ２５Ａ３	溶質キャリアファミリー２５（ミトコンドリアキャリア；リン酸キャリア）、メンバー３	ミトコンドリア膜	トランスポーター
ＴＯＭＭ４０	ミトコンドリア外膜トランスロカーゼ４０ ホモログ（酵母）	ミトコンドリア外膜	イオンチャネル
ＴＳＰＯ	トランスロケータータンパク質（１８ｋＤａ）	ミトコンドリア外膜	膜貫通受容体

【０６０２】

今日まで、糖尿病においてコエンザイムＱ１０で処置された糖尿病性ＨＫ－２細胞において同定された４種のミトコンドリア遺伝子（表３）の役割は特徴付けされていない。

【０６０３】

研究２：糖尿病ＰＣＲアレイを使用するＨＡＳＭＣ細胞における遺伝子発現に対するコエンザイムＱ１０の効果

糖尿病ＰＣＲアレイ（ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、同時に８４種の遺伝子のスクリーニングを提供する。本研究において試験された４種の処置は以下の通りである。

【０６０４】

・ＨＡＳＭＣ；
・ＨＡＳＭＣ Ｈ維持された２２ｍＭ グルコース；
・ＨＡＳＭＣ（Ｈ）＋５０μＭ コエンザイムＱ１０；および
・ＨＡＳＭＣ（Ｈ）＋１００μＭ コエンザイムＱ１０。

【０６０５】

糖尿病アレイ（カタログ番号ＰＡＨＳ－０２３Ｅ，ＳＡＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ ＭＤ）に対するＨＡＳＭＣ試料のリアルタイムＰＣＲデータのストリンジェント分析は、遺伝子調節がＨＡＳＭＣ正常未処置細胞よりも少なくとも２倍の調節ではなく、０．０５未満のｐ値であるすべての結果を排除するように行われた。慢性高血糖またはコエンザイムＱ１０のいずれかによって調節されることが観察された遺伝子が表６８に列挙される。

【表６８】

表６８

遺伝子	HASMC－(H)	p値	HASMC－(H)－５０μM コエンザイムQ１０	p値	HASMC－(H)－１００μM コエンザイムQ１０	p値
AGT	1.3051	0.547507	−1.0169	0.781622	2.3027	0.030195
CCL5	−17.4179	0.013798	−5.3796	0.022489	−4.6913	0.022696
CEACAM1	−5.5629	0.012985	−5.3424	0.014436	−5.8025	0.012948
IL6	2.7085	0.049263	3.8172	0.012685	6.0349	0.000775
INSR	1.4649	0.207788	1.9622	0.081204	2.0801	0.016316
NFKB1	1.482	0.072924	1.3779	0.191191	2.0898	0.027694
PIK3C2B	2.0479	0.218276	1.4331	0.254894	2.6329	0.069422
SELL	−1.9308	0.087513	1.2476	0.393904	4.0371	0.000177
TNF	−1.814	0.108322	−3.2434	0.043526	−1.8489	0.133757

【０６０６】

ＨＡＳＭＣ細胞において、コエンザイムＱ１０での高血糖細胞の処置は、血管機能の調節に関与する遺伝子（ＡＧＴ）、インスリン感受性の調節に関与する遺伝子（ＣＥＡＣＡＭ１、ＩＮＳＲ、ＳＥＬＬ）、および炎症／免疫機能の調節に関与する遺伝子（ＩＬ－６、ＴＮＦ、ＣＣＬ５）の発現の変化を生じた。理論によって束縛されることは望まないが、ＩＮＳＲの発現の増加は、ＨＡＳＭＣ細胞におけるインスリン感受性の増加と関する可能性があり、これは、糖尿病の処置において有益である生理学的特性であり、一方、ＩＬ－６は、その免疫調節特性に加えて、骨格筋細胞、脂肪細胞、肝細胞、膵臓β細胞、および神経内分泌細胞に対する作用によって、直接的と間接的の両方で、グルコースの恒常性および代謝に影響を与えることが提案されてきた。活性化の際に、正常Ｔ細胞は、ＲＡＮＴＥＳおよびケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド（ＣＣＬ５）を発現および分泌する。ＣＣＬ５は脂肪細胞によって発現され、血清レベルのＲＡＮＴＥＳは肥満および２型糖尿病において増加される。しかし、表６８において示されるように、コエンザイムＱ１０でのＨＡＳＭＣ細胞の処置は、ＣＣＬ５の発現の有意な減少を引き起こす。前述のデータに基づいて、コエンザイムＱ１０の投与が、糖尿病の管理における処置的な利点を有することが予測される。

【０６０７】

ミトコンドリアアレイを使用するＨＡＳＭＣ細胞中での遺伝子発現に対するコエンザイムＱ１０の効果

糖尿病におけるミトコンドリア遺伝子の示差的な発現は、ミトコンドリアアレイ（カタログ番号ＰＡＨＳ　０８７Ｅ、ＳＡＢｉｓｏｃｉｅｎｃｅｓ　Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　ＭＤ）を使用してアッセイされた。慢性高血糖および／またはコエンザイムＱ１０処置によって調節された遺伝子は表６９に示される。

【表６９】

表６９

遺伝子	ＨＡＳＭＣ－（H）	p値	ＨＡＳＭＣ－（H）５０μＭコエンザイムＱ１０	p値	HASMC－（H）－１００ μＭ Coenzyme Q10	p値
BCL2L1	－1．6558	0．244494	－2．7863	0．008744	－2．3001	0．014537
MFN1	－1．4992	0．317009	－1．2585	0．021185	－2．2632	0．005961
PMAIP1	－4．7816	0．206848	－6．8132	0．000158	－4．352	0．000286
SLC25A1	－2．2051	0．020868	－1．834	0．00581	－3．0001	0．03285
SLC25A13	－2．0527	0．035987	－1．5	0．029019	－1．5245	0．043712
SLC25A19	－1．0699	0．417217	－1．4257	0．104814	－2．1214	0．007737
SLC25A22	－2．1747	0．007344	－1．9839	0．0013	－10．3747	0．003437
TIMM44	－1．3605	0．414909	－2．3214	0．004118	－1．9931	0．010206
TOMM40	－1．1982	0．428061	－2．0922	0．002195	－2．2684	0．003272
TSPO	－1．402	0．304875	－2．0586	0．061365	－2．3647	0．044656

【０６０８】

コエンザイムＱ１０でのＨＡＳＭＣ細胞の処置は、プログラムされた細胞死、すなわち、アポトーシスを調節する遺伝子（ＢＣＬ２Ｌ１、ＮＯＸＡとしても知られるＰＭＩＡＰ１）、トランスポータータンパク質（ＳＬＣ２５Ａ１［クエン酸トランスポーター］、ＳＬＣ２５Ａ１３［アスパラギン酸－グルタミン酸エクスチェンジャー］、ＳＬＣ２５Ａ１９［チアミンピロリン酸トランスポーター］、およびＳＬＣ２５Ａ２２［グルタミン酸－水素同時トランスポーター］）、およびミトコンドリアマトリックス輸送タンパク質（ＭＦＮ１、ＴＩＭＭ４４、およびＴＯＭＭ４０）の発現の変化を生じた。これらのトランスポーターの活性は、クレブス回路のために必須の前駆体の調節、およびミトコンドリアの酸化的リン酸化の維持において重要な役割を果たしている。これらの結果は、コエンザイムＱ１０への糖尿病性ＨＡＳＭＣ細胞の曝露は、細胞質およびミトコンドリアの遺伝子の発現の変化と関連し、これは次には、コエンザイムＱ１０と一致しており、糖尿病の処置における治療の利点を提供する。

【０６０９】

コエンザイムＱ１０でＨＡＳＭＣ細胞およびＨＫ－２細胞を処置することによって、または高血糖性環境において得られたデータの比較は、４種の遺伝子が両方の細胞系統（例えば、遺伝子発現アッセイにおけるＰＩＫ３Ｃ２ＢおよびＳＥＬＬならびにミトコンドリアアレイアッセイにおけるＴＯＭＭ４０およびＴＳＰＯ）においてコエンザイムＱ１０によって共通して調節されることを明らかにする。これらの結果は、糖尿病環境におけるコエンザイムＱ１０での細胞の処置が、糖尿病の原因または処置に関与することが知られている遺伝子の発現の変化に関連することを実証する。

【０６１０】

等価物

当業者は、日常的な範囲を超えない実験を使用して、本明細書に記載された特定の実施形態および方法の多くの等価物を認識し、またはそれを確認することが可能である。このような等価物は、添付の特許請求の範囲の範囲に包含されることが意図される。

【図１】

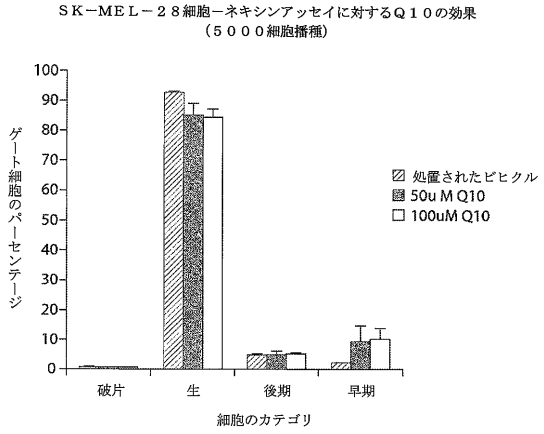


図１

【図２】

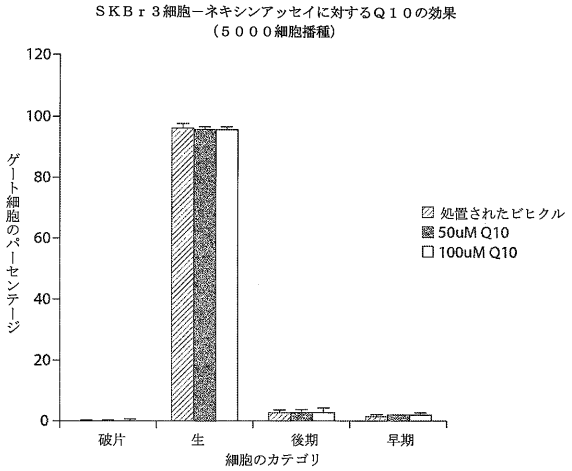


図２

【図３】

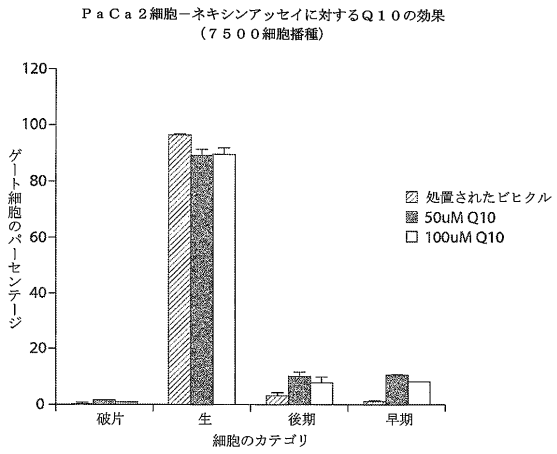


図３

【図４】

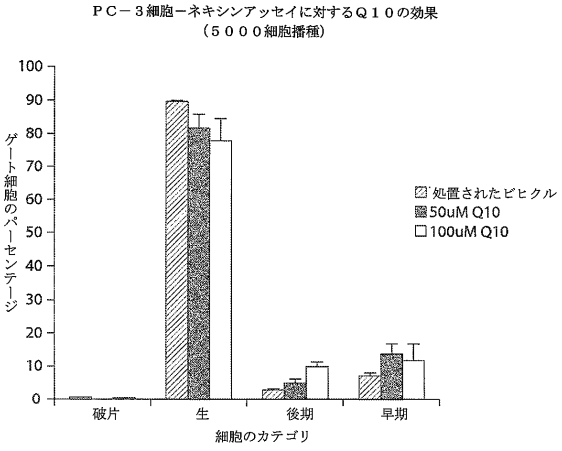


図４

【図５】

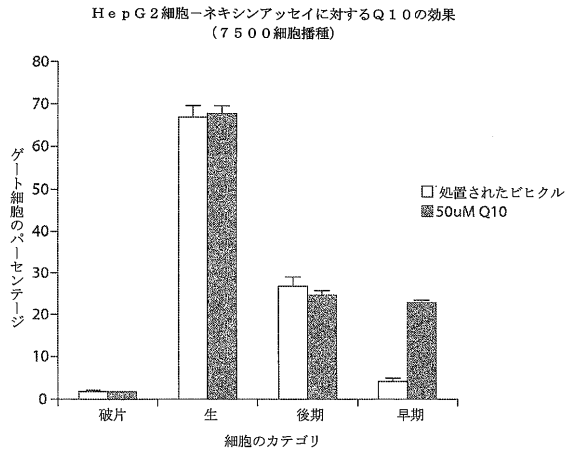


図５

【図６】

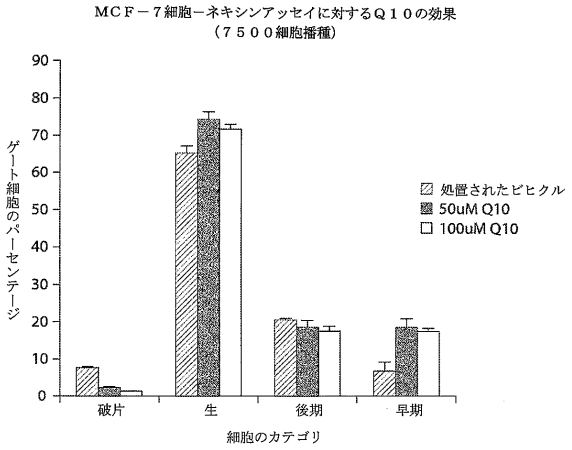


図６

【図７】

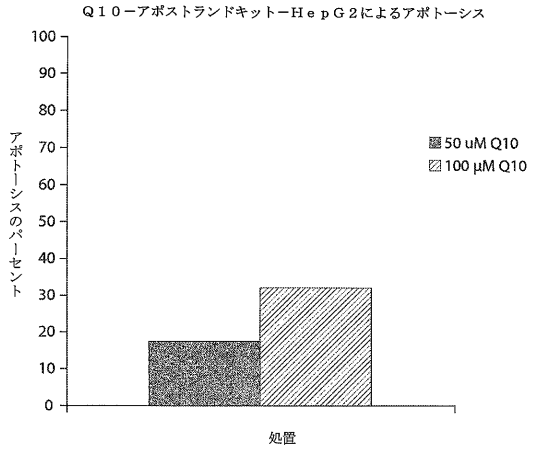


図７

【図８】

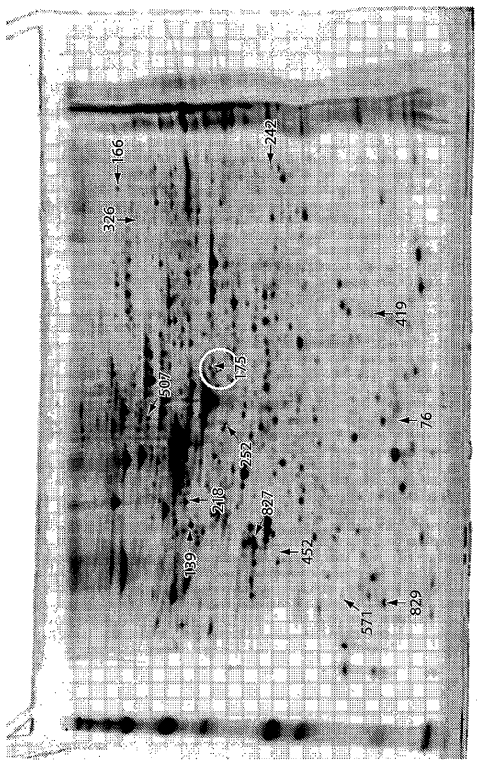


図８

【図９】

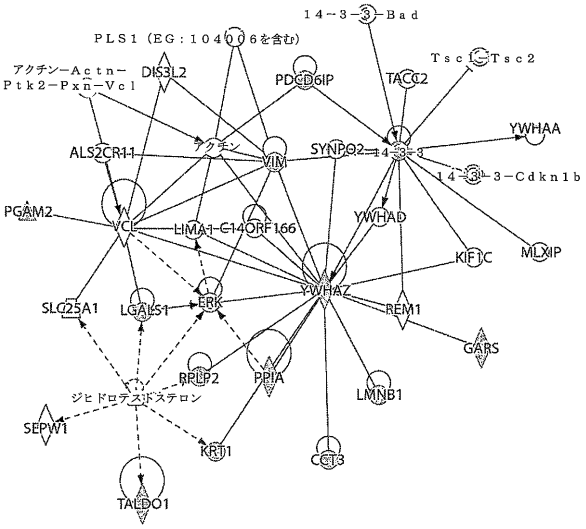


図９

【図１０】

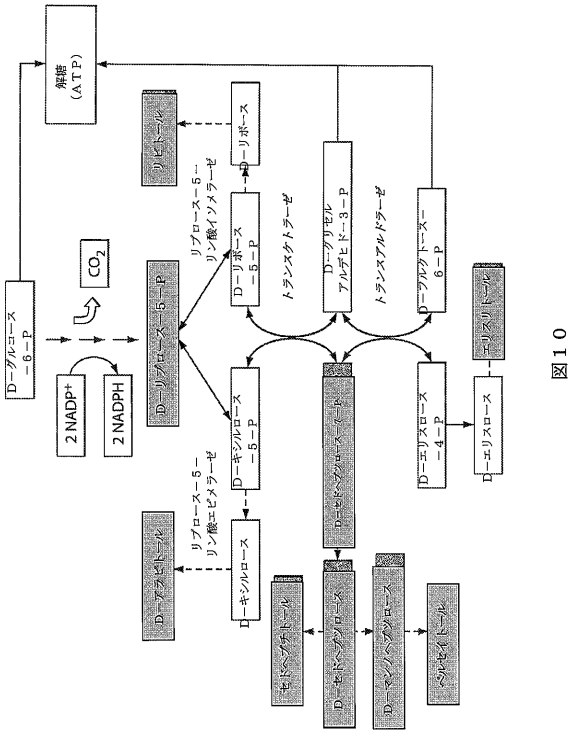


図１０

【図１１】

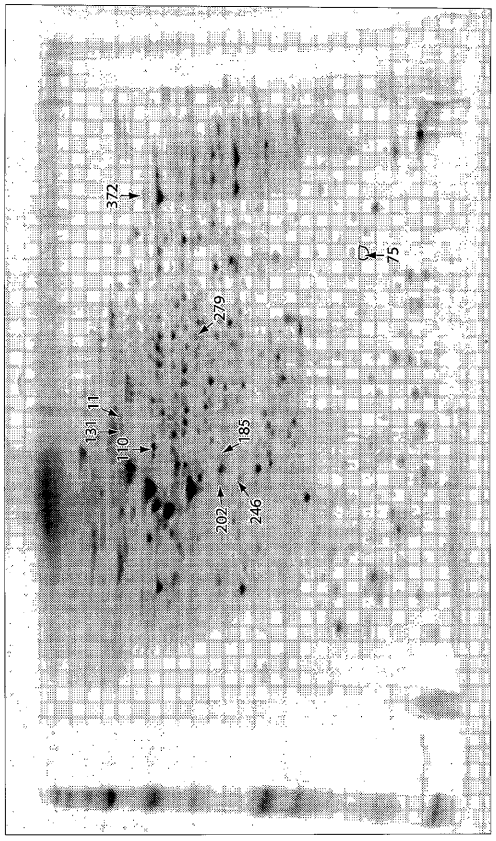


図１１

【図１２】

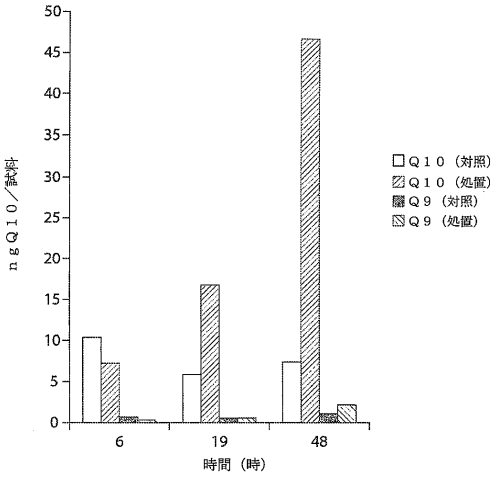


図１２

【図１３Ａ】

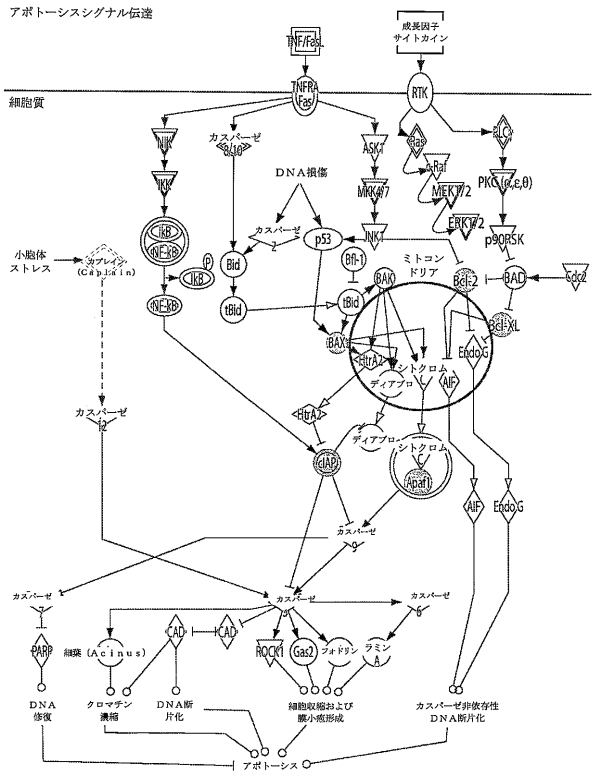


図１３Ａ

【図１３Ｂ】

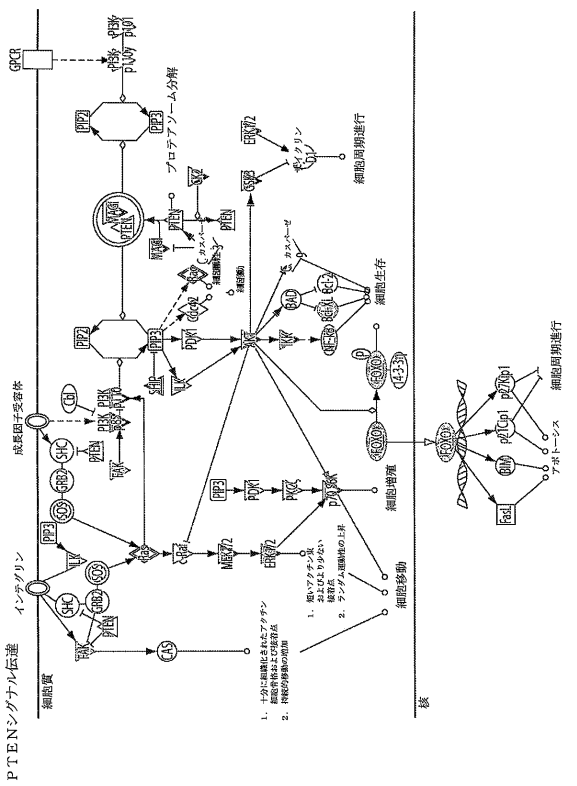


図１３Ｂ

【図１４】

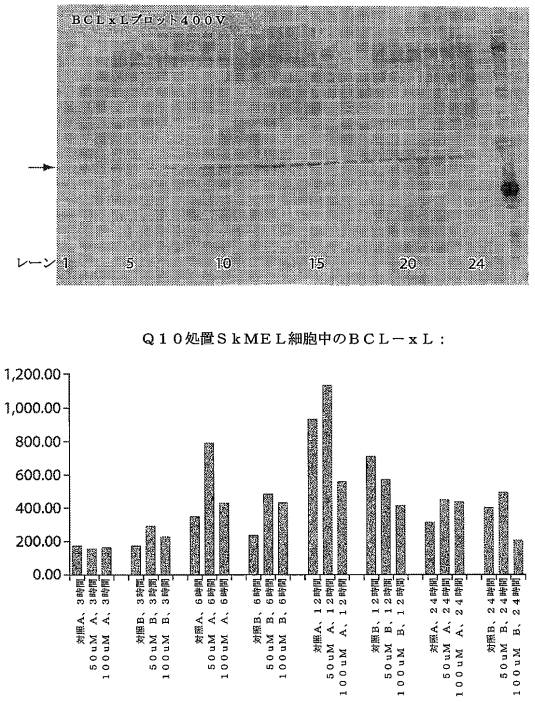


図１４

【図１５】

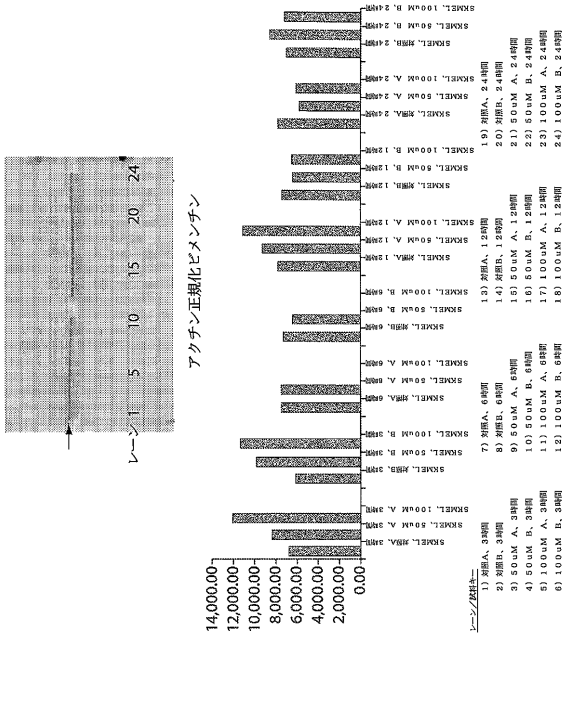


図１５

【図１６】

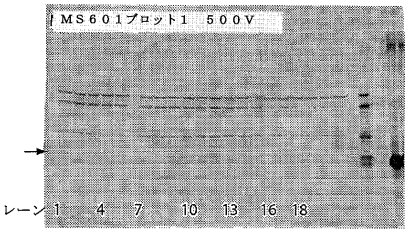


図１６

【図１７】

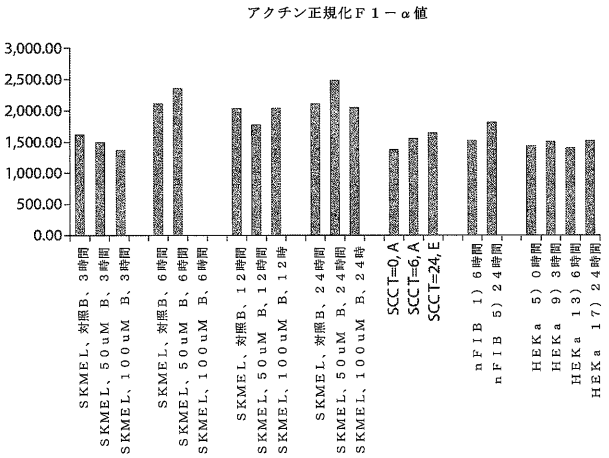


図１７

【図１８】

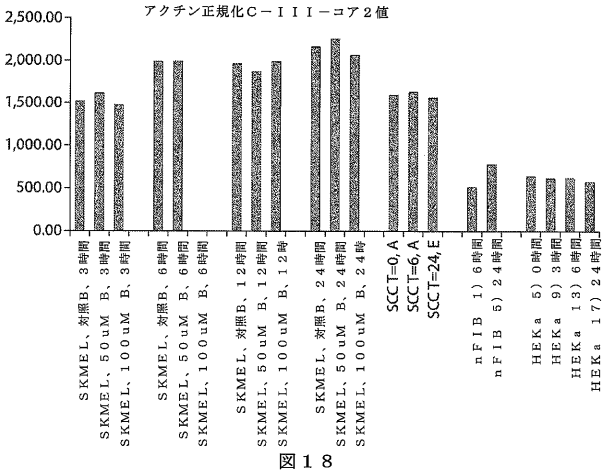


図１８

【図１９】

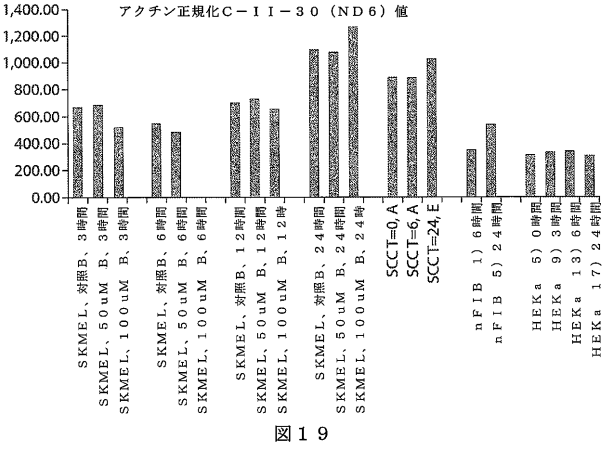


図１９

【図２０】

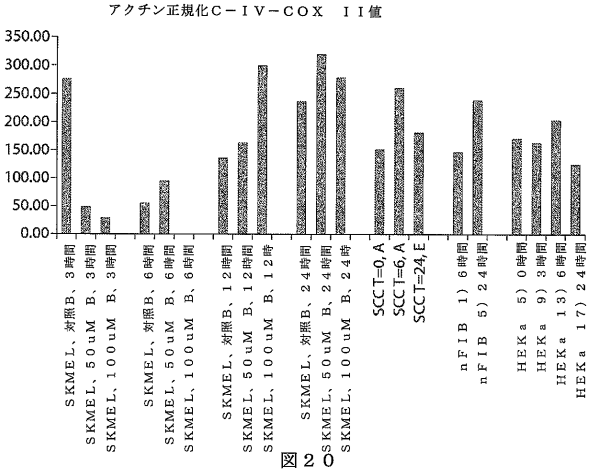


図２０

【図２１】

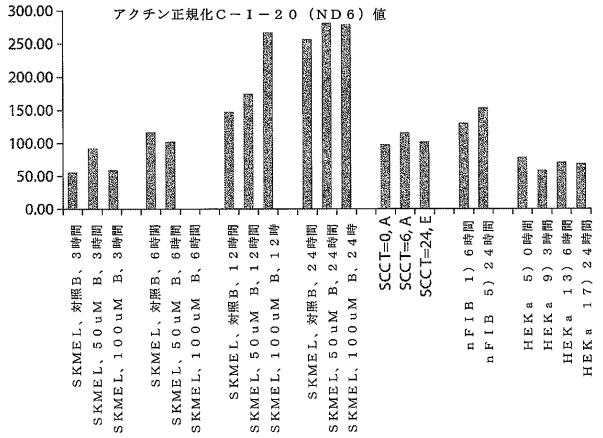


図２１

【図２２】

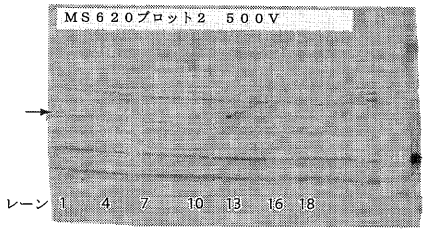


図２２

【図２３】

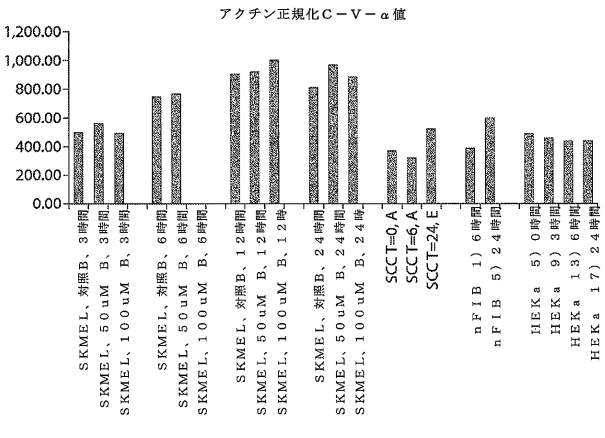


図２３

【図２４】

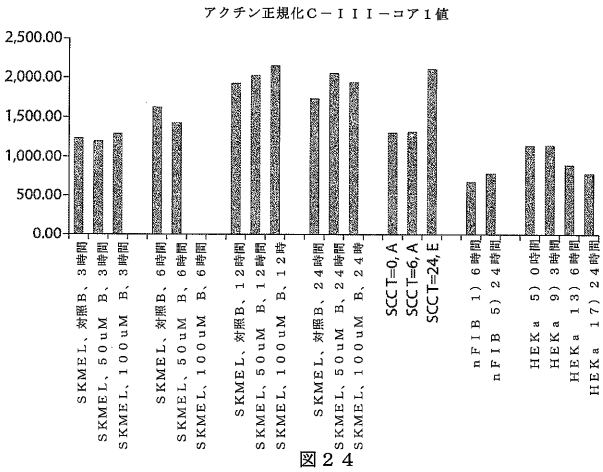


図２４

【図２５】

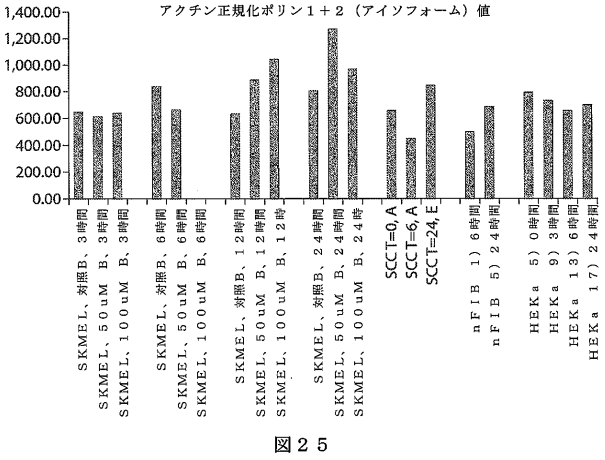


図２５

【図２６】

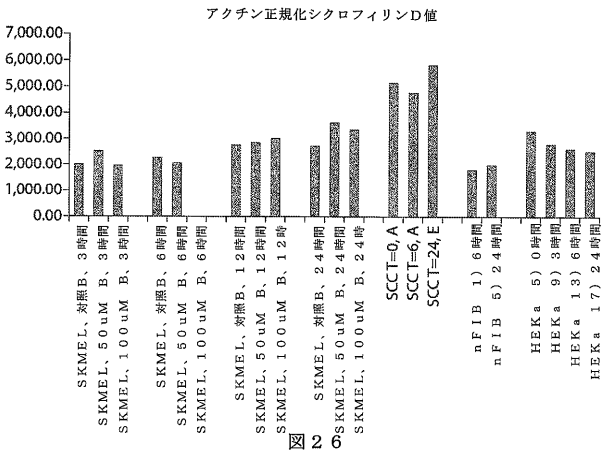


図２６

【図２７】

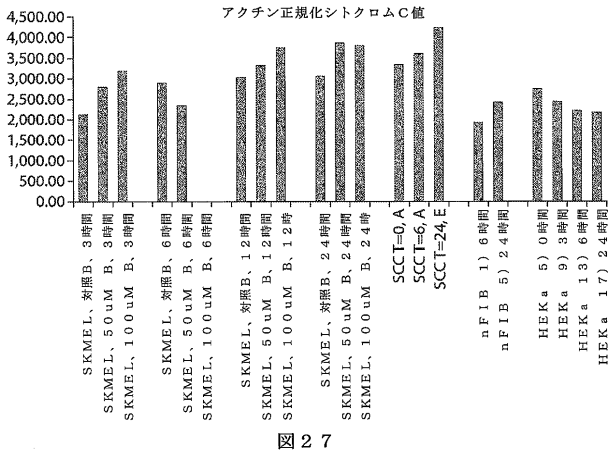


図２７

【図２８】

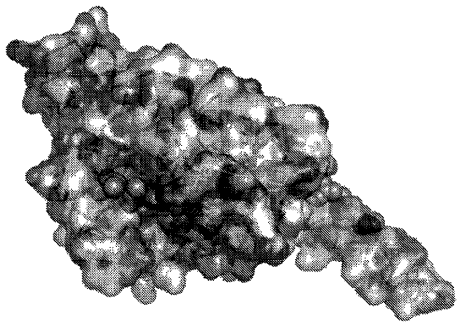


図２８

【図２９】

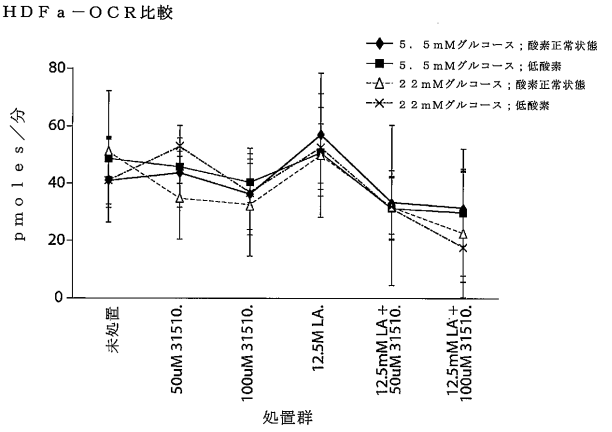


図２９

【図３０】

ＨＡＳＭＣ－ＯＣＲ比較

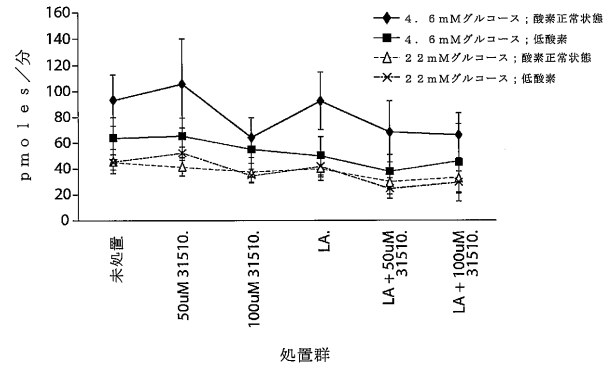


図３０

【図３１】

ＭＣＦ－７－ＯＣＲ比較

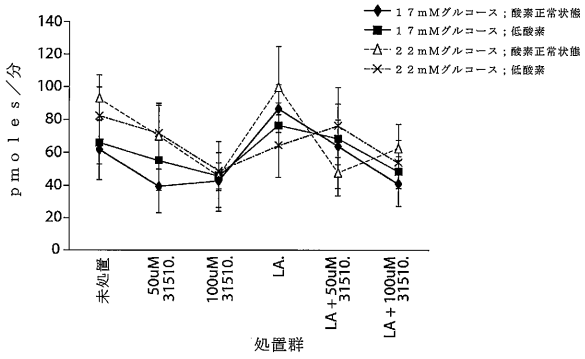


図３１

【図３２】

ＰａＣａ２－ＯＣＲ比較

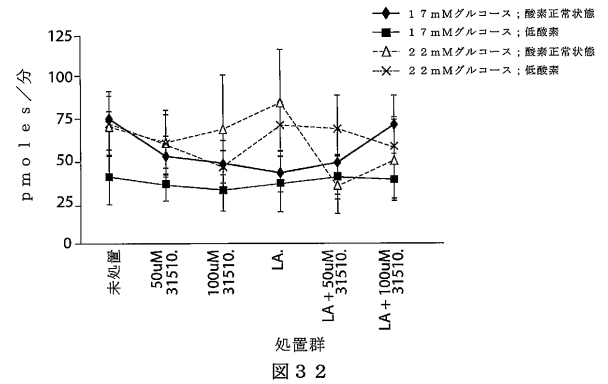


図３２

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/034420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C40B 40/10(2006.01)i, C40B 40/08(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)

G01N 33/68; C12N 5/06; C07K 14/47; G01N 33/53; A61K 48/00; A61K 31/44; G01N 33/50; C12Q 1/68; C07K 16/40

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

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

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

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: metabolic disorder, expression, marker, energy shift, mitochondrial oxidative phosphorylation

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	US 2002-0098169 A1 (ULF SMITH) 25 July 2002 See abstract, claims 7,32,36,37	7,9 44-48 8,10
Y A	US 2007-0054282 A1 (Liew, C.) 08 March 2007 See abstract, claims 1,2,10,18-21	44-48 7-10
A	US 2005-0042678 A1 (STEPHEN, E EPSTEIN et al.) 24 February 2005 See abstract, claims 1-3.	7-10,44-48
A	WO 2008-049330 A1 (THE UNIVERSITY OF HONG KONG et al.) 02 May 2008 See abstract, claims 1,2.	7-10,44-48
A	US 2005-0118151 A1 (PETER LARSEN et al.) 02 June 2005 See abstract.	7-10,44-48

☐ 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 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	Date of mailing of the international search report
31 JANUARY 2011 (31.01.2011)	**07 FEBRUARY 2011 (07.02.2011)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer CHO, Hyun Kyung Telephone No. 82-42-481-5629

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/034420

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002-0098169 A1	25.07.2002	AU 2001-74722 A1	17.12.2001
		EP 1287030 A1	05.03.2003
		US 6835819 B2	28.12.2004
		WO 01-94410 A1	13.12.2001
US 2007-0054282 A1	08.03.2007	AU 2000-18536 A1	24.07.2000
		AU 2004-249318 A1	29.12.2004
		CA 2359816 C	03.08.2010
		CA 2359816-A1	13.07.2000
		CA 2530191-A1	29.12.2004
		CA 2588072-A1	26.05.2006
		CA 2702148-A1	13.07.2000
		CN 101415836 A	22.04.2009
		EP 1643893 A2	12.04.2006
		EP 1643893 A4	05.12.2007
		EP 1815020 A2	08.08.2007
		JP 2007-528704 A	18.10.2007
		JP 2007-528704 T	18.10.2007
		US 2004-0013663 A1	22.01.2004
		US 2004-0014059 A1	22.01.2004
		US 2004-0037841 A1	26.02.2004
		US 2004-0241726 A1	02.12.2004
		US 2004-0241727 A1	02.12.2004
		US 2004-0241728 A1	02.12.2004
		US 2004-0241729 A1	02.12.2004
		US 2004-0248169 A1	09.12.2004
		US 2004-0248170 A1	09.12.2004
		US 2004-0265868 A1	30.12.2004
		US 2004-0265869 A1	30.12.2004
		US 2005-0003394 A1	06.01.2005
		US 2005-0042630 A1	24.02.2005
		US 2005-0079514 A1	14.04.2005
		US 2005-0123938 A1	09.06.2005
		US 2005-0191637 A1	01.09.2005
		US 2005-0196762 A1	08.09.2005
		US 2005-0196763 A1	08.09.2005
		US 2005-0196764 A1	08.09.2005
		US 2005-0208505 A1	22.09.2005
		US 2005-0208519 A1	22.09.2005
		US 2006-0134635 A1	22.06.2006
		US 2006-0134637 A1	22.06.2006
		US 2007-0031841 A1	08.02.2007
		US 2007-0105121 A1	10.05.2007
		US 7432049 B2	07.10.2008
		US 7473528 B2	06.01.2009
		US 7598031 B2	06.10.2009
		US 7662558 B2	16.02.2010
		WO 00-40749 A2	13.07.2000
		WO 00-40749 A3	13.07.2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/034420

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.: 1-6, 11-43, 54-55
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-6, 11-43, 54-55 pertain to methods for treatment of the human by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 14-15, 17, 20, 23-24,
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:
Claims 14-15, 17, 20, 23-24 are dependent on claims 13, 17, 19, or 22 which are multiple dependent claims.

3. ☒ Claims Nos.: 12-13, 16, 18-19, 21-22, 25-35, 38-43, 49-53
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 addtional 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/034420

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2004-112589 A2	29.12.2004
		WO 2004-112589 A3	11.12.2008
		WO 2006-055524 A2	26.05.2006
		WO 2006-055524 A3	26.05.2006
US 2005-0042678 A1	24.02.2005	CA 2465900-A1	15.05.2003
		EP 1451580 A2	01.09.2004
		EP 1451580 A4	26.10.2005
		EP 1451580 B1	08.07.2009
		KR 10-2004-0068545 A	31.07.2004
		US 7527932 B2	05.05.2009
		WO 03-039349 A2	15.05.2003
		WO 03-039349 A3	15.05.2003
WO 2008-049330 A1	02.05.2008	US 2008-095782 A1	24.04.2008
		US 7645616 B2	12.01.2010
US 2005-0118151 A1	02.06.2005	AU 2002-344252 A8	09.12.2002
		EP 1402257 A1	31.03.2004
		EP 1402257 B1	21.01.2009
		EP 1421390 A2	26.05.2004
		EP 2161578 A1	10.03.2010
		US 2006-0008881 A1	12.01.2006
		US 2008-0145868 A1	19.06.2008
		US 7279274 B2	09.10.2007
		WO 02-097434 A1	05.12.2002
		WO 02-097441 A2	05.12.2002
		WO 02-097441 A3	05.12.2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/198*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/198	４Ｃ２０６
Ａ６１Ｋ	*31/426*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/426	
Ａ６１Ｋ	*31/122*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/122	
Ａ６１Ｋ	*31/593*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/593	
Ａ６１Ｋ	*31/7076*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7076	
Ａ６１Ｋ	*31/205*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/205	
Ａ６１Ｋ	*38/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02	
Ａ６１Ｐ	*3/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00	
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53 D	
Ｇ０１Ｎ	*33/48*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53 M	
Ｇ０１Ｎ	*33/50*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53 Y	
Ｇ０１Ｎ	*33/15*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/48 P	
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50 Z	
			Ｇ０１Ｎ	33/15 Z	
			Ｃ１２Ｎ	15/00 A	

(31)優先権主張番号 61/177,245
(32)優先日 平成21年5月11日(2009.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/177,244
(32)優先日 平成21年5月11日(2009.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IS,JP,KE,KG,KM,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＪＡＶＡ

(72)発明者 ナライン，ナイヴン，ラジン
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州，ケンブリッジ，スイート ２００５，サードストリート ３５０
(72)発明者 マクック，ジョン，パトリック
アメリカ合衆国 ７５０３４ テキサス州，フリスコ，サザン ヒルズ ドライブ ４９１３
(72)発明者 サランガラハン，ランガプラサド
アメリカ合衆国 ０１５４３ マサチューセッツ州，ラットランド，ウィニフレッズ ウェイ ２１

Ｆターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA25 AA29 AA40 BA13 BB20 CA25 CB01 CB03
CB07 CB09 CB13 CB17 CB19 CB26 DA20 DA28 DA31 DA36
FA12 FB01 FB02 FB03 FB15
4B024 AA11 CA09 CA12 HA12
4B063 QA19 QQ03 QQ21 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR48 QR55

	QR62	QS15	QS25	QS33	QS34	QX02				
4C084	AA02	AA17	BA26	BA44	DA01	DA12	DA17	DA25	DA40	DB34
	NA14	ZC211								
4C086	AA01	AA02	BC82	DA14	DA21	EA18	MA01	MA04	NA14	ZC21
4C206	AA01	AA02	CB27	FA53	FA59	GA07	GA36	JA58	MA01	MA04
	NA14	ZC21								

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2012526554A5	公开(公告)日	2015-05-14
申请号	JP2012510948	申请日	2010-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	伯格生物有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	伯格生物系统公司，有限责任公司		
[标]发明人	ナラインナイヴンラジン マクックジョンパトリック サランガラハンランガプラサド		
发明人	ナライン,ナイヴン,ラジン マクック,ジョン,パトリック サランガラハン,ランガプラサド		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 A61K38/28 A61K31/64 A61K31/195 A61K31/198 A61K31/426 A61K31/122 A61K31/593 A61K31/7076 A61K31/205 A61K38/00 A61P3/00 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09		
CPC分类号	A61K31/00 A61K31/122 A61K31/194 A61K2121/00 C12Q1/68 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/5308 G01N33/5735 G01N33/57484 G01N33/6893 G01N2570/00 G01N2800/04 G01N2800/042 G01N2800/52 G01N2800/7028 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P13/12		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K45/00 A61K37/26 A61K31/64 A61K31/195 A61K31/198 A61K31/426 A61K31/122 A61K31/593 A61K31/7076 A61K31/205 A61K37/02 A61P3/00 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB09 2G045/CB13 2G045/CB17 2G045/CB19 2G045/CB26 2G045/DA20 2G045/DA28 2G045/DA31 2G045/DA36 2G045/FA12 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB15 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ21 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA26 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/DA12 4C084/DA17 4C084/DA25 4C084/DA40 4C084/DB34 4C084/NA14 4C084/ZC211 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC82 4C086/DA14 4C086/DA21 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZC21 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/CB27 4C206/FA53 4C206/FA59 4C206/GA07 4C206/GA36 4C206/JA58 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZC21		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/177241 2009-05-11 US 61/177243 2009-05-11 US 61/177246 2009-05-11 US 61/177245 2009-05-11 US 61/177244 2009-05-11 US		
其他公开文献	JP2012526554A JP6169846B2		

摘要(译)

使用表位代谢移位器，多维细胞内分子或环境影响因子描述了用于诊断人类代谢紊乱的方法和制剂。 [选图]图1