

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 520575

(P2003 - 520575A)

(43)公表日 平成15年7月8日(2003.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 L 27/00	G 4 B 0 2 4
A 6 1 L 27/00		A 6 1 P 19/02	4 B 0 6 3
A 6 1 P 19/02		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 1
C 1 2 Q 1/02		1/26	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全177数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 523789(P2001 - 523789)

(86)(22)出願日 平成12年9月15日(2000.9.15)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月14日(2002.3.14)

(86)国際出願番号 PCT/US00/25317

(87)国際公開番号 W001/020018

(87)国際公開日 平成13年3月22日(2001.3.22)

(31)優先権主張番号 60/154,145

(32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/661,848

(32)優先日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 マイトコー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,
サン ディエゴ, ソレント バレー ロ
ード 11494

(72)発明者 マーフィー, アン エヌ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024,
エンシニタス, コール ランチ ロード
310

(72)発明者 ディケンズ, ジェームズ エイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024,
エンシニタス, プレザント グローブ
ロード 2117

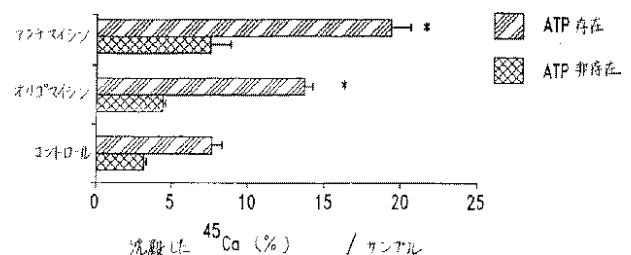
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 関節炎障害を診断および処置するためおよび骨質量を調節するための方法および組成物

(57)【要約】

本発明は、変更されたミトコンドリア機能の1つ以上の指標のレベルを比較することによって、ヒトにおける関節炎障害を発症する危険性の初期の検出のための改善された診断方法、および関節炎障害の処置において有用な治療薬剤のためのスクリーニングアッセイに関する。変更されたミトコンドリア機能の指標としては、ミトコンドリア酵素およびATP生合成因子などの酵素が挙げられる。変更されたミトコンドリア機能の他の指標としては、ミトコンドリア質量、ミトコンドリア数およびミトコンドリアDNA含有量、上昇した細胞内カルシウムおよびアポトーシス誘導因子に対する細胞性応答ならびにフリーラジカル生成が挙げられる。変更されたミトコンドリア機能の開示された指標に関する方法のようなヒト患者を処置および層別化する方法もまた提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 脊椎動物被験体における関節炎障害の危険性を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

該被験体由来の生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを、コントロールサンプルと比較する工程であって、該指標の変更されたレベルが、該患者が関節炎障害を有するかまたは該関節炎障害を発症する危険があることを示す、工程；ならびに、該レベルから該関節炎障害の危険を同定する、工程、
を包含する、方法。

【請求項2】 関節炎障害を有する脊椎動物被験体における疾患進行の程度を決定する方法であって、該方法は、以下の工程：

第1および第2の生物学的サンプルのそれぞれにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを、第1の時点および第2の時点で該患者から獲得される該第1および第2の生物学的サンプルとそれぞれ比較する工程であって、該第1の時点と第2の時点との間の該指標の変更されたレベルが疾患の進行を示す、工程；ならびに、該レベルから該関節炎障害の進行の程度を決定する、工程、
を包含する、方法。

【請求項3】 関節炎障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置するのに適した薬剤を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

候補薬剤の存在下および非存在下で、該被験体から獲得された1つ以上の生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程であって、該指標の変更されたレベルが、該薬剤がミトコンドリア機能を変更することを示す、工程；ならびに、該レベルから該関節炎障害を処置するための該候補薬剤の適合性を決定する、工程、
を包含する、方法。

【請求項4】 関節炎障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置するための薬剤の適合性を決定する方法であって、この方法は、以下の工程：

該被験体に候補薬剤を投与する前および後に、該被験体から獲得された生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程であって、該指標の変更されたレベルは、該薬剤がミトコンドリア機能を変更することを示す、工程；ならびに、該レベルから該関節炎障害を処置するための該候補薬剤の適合性を決定する、工程、を包含する、方法。

【請求項5】 関節炎障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置するための薬剤の適合性を決定する方法であって、該方法は、以下の工程：

該患者のそれぞれに候補薬剤を投与する前および後に、複数の被験体から得られた少なくとも1つの生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程であって、該指標の変更されたレベルは、該薬剤がミトコンドリア機能を変更することを示す、工程；ならびに、該レベルから該関節炎障害を処置するための該候補薬剤の適合性を決定する、工程、を包含する、方法。

【請求項6】 関節炎障害のサブタイプに従って脊椎動物種の被験体を層別化する方法であって、この方法は、以下の工程：

該種の複数の被験体のそれぞれから獲得された少なくとも1つの生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する、工程；ならびに、該レベルから該関節炎障害のサブタイプに従って、該被験体を層別化する工程、を包含する、方法。

【請求項7】 関節炎障害のサブタイプに従って脊椎動物種の被験体を層別化する方法であって、この方法は、以下の工程：

該被験体のそれぞれに候補薬剤を投与する前および後に、該種の複数の被験体のそれぞれから獲得された生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程であって、該指標の変更されたレベルが、該薬剤がミトコンドリア機能を変更することを示す、工程；なら

びに、該レベルから、該関節炎障害のサブタイプに従って、該被験体を層別化する工程、
を包含する、方法。

【請求項8】 前記脊椎動物被験体が、ヒト、イヌ、ウシ、ブタ、ネコ、ウマ、ヤギおよびヒツジからなる群から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 前記脊椎動物被験体がヒトである、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 前記関節炎障害が、変形性関節症、変性関節疾患、慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、軟骨石炭化症、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節炎、形成異常症、紅斑性狼瘡、痛風性および感染性関節炎からなる群より選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 前記生物学的サンプルが、軟骨細胞および造血細胞からなる群から選択される細胞を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 前記軟骨細胞が関節性軟骨細胞である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記造血細胞が、血小板および有核の末梢血球からなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 前記有核末梢血球が、リンパ球、単球および顆粒球からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記生物学的サンプルが、関節性軟骨細胞を含み、そして、前記比較する工程が、トランスホーミング増殖因子 β の非存在下または存在下における変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含する、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】 前記変更されたミトコンドリア活性の該指標がヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記生物学的サンプルが、軟骨細胞に由来するマトリックス小胞を含み、そして、変更されたミトコンドリア機能の指標が、ピロリン酸塩、ATPおよびヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼからなる群から選択される

、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 前記生物学的サンプルが軟骨細胞を含み、そして、変更されたミトコンドリア機能の指標が、少なくとも1つの細胞外マトリックス成分の軟骨細胞による同化作用である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 前記比較する工程が、トランスホーミング増殖因子 β の非存在下または存在下で同化された少なくとも1つの細胞外マトリックス成分のレベルを比較する工程を包含する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記細胞外マトリックス成分が、コラーゲン、プロテオグリカン、無機ピロリン酸、リン酸カルシウムおよびリン酸カルシウム二水和物(CPPD)からなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 前記コラーゲンが、I型コラーゲン、II型コラーゲン、X型コラーゲンおよびXI型コラーゲンからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記生物学的サンプルがサイブリッド細胞を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】 前記比較する工程が、解糖を低下させずに少なくとも1つの電子伝達系酵素の活性を低下するのに十分な条件下および時間で、ミトコンドリア機能の少なくとも1つのインヒビターの非存在下または存在下で、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含する、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】 前記ミトコンドリア機能のインヒビターが、アンチマイシン、オリゴマイシン、ロテノンおよびシアン化物からなる群から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、ミトコンドリア電子伝達系酵素である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】 前記比較する工程が、電子伝達系酵素触媒活性を測定する工程を包含する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記測定する工程が、該サンプルにおける1つのミトコンドリアあたりの酵素活性を決定する工程を包含する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記測定する工程が、該サンプル中におけるタンパク質の1単位あたりの酵素活性を決定する工程を包含する、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記比較する工程が、電子伝達系酵素量を測定する工程を包含する、請求項25に記載の方法。

【請求項30】 前記測定する工程が、該サンプルにおけるミトコンドリアあたりの酵素量を決定する工程を包含する、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 前記測定する工程が、該サンプルにおけるタンパク質の1単位あたりの酵素量を決定する工程を包含する、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 前記ミトコンドリア電子伝達系酵素が、ミトコンドリア複合体Iの少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項33】 前記ミトコンドリア電子伝達系酵素が、ミトコンドリア複合体IIの少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項34】 前記ミトコンドリア電子伝達系酵素が、ミトコンドリア複合体IIIの少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項35】 前記ミトコンドリア電子伝達系酵素が、ミトコンドリア複合体IVの少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項36】 前記ミトコンドリア複合体IVの少なくとも1つのサブユニットが、COX1、COX2およびCOX4からなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記ミトコンドリア電子伝達系酵素が、ミトコンドリア複合体Vの少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項38】 前記ミトコンドリア複合体Vの少なくとも1つのサブユニットが、ATPシンターゼサブユニット8およびATPシンターゼサブユニット6からなる群から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、該細胞における1つの細胞あたりのATPの量である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】 前記比較する工程が、該サンプルにおけるミトコンドリアあたりのATPの量を測定する工程を包含する、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記比較する工程が、該サンプルにおけるタンパク質の1単位あたりのATPの量を測定する工程を包含する、請求項39に記載の方法。

【請求項42】 前記比較する工程が、該サンプルにおけるミトコンドリア質量の1単位あたりのATPの量を測定する工程を包含する、請求項39に記載の方法。

【請求項43】 前記比較する工程が、該サンプルにおけるミトコンドリアタンパク質の単位あたりのATPの量を測定する工程を包含する、請求項39に記載の方法。

【請求項44】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、前記サンプルにおけるATP合成の速度である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、ATP生合成因子である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】 前記比較する工程が、ATP生合成因子触媒活性を測定する工程を包含する、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記測定する工程が、前記サンプルにおける1つのミトコンドリアあたりのATP生合成因子触媒活性を測定する工程を包含する、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 前記測定する工程が、前記サンプルにおけるミトコンドリア質量の1単位あたりのATP生合成因子触媒活性を測定する工程を包含する、請求項46に記載の方法。

【請求項49】 前記測定する工程が、前記サンプルにおけるタンパク質の1単位あたりのATP生合成因子触媒活性を測定する工程を包含する、請求項46に記載の方法。

【請求項50】 前記比較する工程が、ATP生合成因子量を測定する工程を包含する、請求項45に記載の方法。

【請求項51】 前記測定する工程が、前記サンプルの1つのミトコンドリアあたりのATP生合成因子量を測定する工程を包含する、請求項50に記載の方法。

【請求項52】 前記測定する工程が、前記サンプルのタンパク質の1単位あたりのATP生合成因子量を測定する工程を包含する、請求項50に記載の方法。

【請求項53】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、ミトコンドリアマトリックス成分である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、ミトコンドリア膜成分である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】 前記ミトコンドリア膜成分が、ミトコンドリア内膜成分である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記ミトコンドリア膜成分が、アデニンヌクレオチド輸送体(ANT)、電圧依存陰イオンチャネル(VDAC)、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトル、カルシウム単輸送体、UCP-1、UCP-2、UCP-3、ヘキソキナーゼ、末梢ベンゾジアゼピンレセプター、ミトコンドリア膜間クレアチンキナーゼ、シクロフィリンD、Bcl-2遺伝子ファミリーをコードするポリペプチド、トリカルボン酸キャリアおよびジカルボン酸キャリアからなる群から選択される、請求項54に記載の方法。

【請求項57】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、クレブス回路酵素である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】 前記比較する工程が、クレブス回路酵素触媒活性を測定する工程を包含する、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 前記測定する工程が、前記サンプルの1つのミトコンドリアあたりの酵素活性を決定する工程を包含する、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記測定する工程が、前記サンプルのタンパク質の1単位あたりの酵素活性を決定する工程を包含する、請求項58に記載の方法。

【請求項61】 前記比較する工程が、クレブス回路酵素量を測定する工程を包含する、請求項57に記載の方法。

【請求項62】 前記測定する工程が、前記サンプルの1つのミトコンドリアあたりの酵素量を決定する工程を包含する、請求項61に記載の方法。

【請求項63】 前記測定する工程が、前記サンプル中のタンパク質の1単

位あたりの酵素量を決定する工程を包含する、請求項61に記載の方法。

【請求項64】 前記クレブス回路酵素がクエン酸シンターゼである、請求項57に記載の方法。

【請求項65】 前記クレブス回路酵素が、アコニターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル補酵素Aシンセターゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、フマラーゼおよびリンゴ酸デヒドロゲナーゼからなる群から選択される、請求項57に記載の方法。

【請求項66】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、前記サンプルにおける1つの細胞あたりのミトコンドリア質量である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項67】 前記ミトコンドリア質量が、ミトコンドリア選択的薬剤を使用して決定される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記ミトコンドリア質量が、ノニルアクリジンオレンジを使用して決定される、請求項66に記載の方法。

【請求項69】 前記ミトコンドリア質量が、形態計測分析により決定される、請求項66に記載の方法。

【請求項70】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、前記サンプル中の1つの細胞あたりのミトコンドリアの数である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項71】 前記比較する工程が、ミトコンドリア選択的試薬を測定する工程を包含する、請求項70に記載の方法。

【請求項72】 前記ミトコンドリア選択的試薬が蛍光性である、請求項71に記載の方法。

【請求項73】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、前記サンプルにおける1つの細胞あたりのミトコンドリアDNAの量を含む変更されたミトコンドリア機能の同時予測指標であり、そして、前記比較する工程が、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つのさらなる指標を比較する工程をさらに包含する、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項74】 請求項73に記載の方法であって、前記比較する工程が、

前記ミトコンドリアDNAに対する該プライマーのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下および時間で、該ミトコンドリアDNAに存在する配列に相補的であるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと、該ミトコンドリアDNAを含む生物学的サンプルとを接触させることによって、該ミトコンドリアDNAを測定する、工程；ならびに、該ミトコンドリアDNAに対する該プライマーのハイブリダイゼーションを検出する工程であって、検出によって該ミトコンドリアDNAを定量する、工程、を包含する、方法。

【請求項75】 前記検出する工程が、ポリメラーゼ連鎖反応、オリゴヌクレオチドプライマー伸長アッセイ、リガーゼ連鎖反応、および制限フラグメント長多型分析からなる群から選択される技術を包含する、請求項74に記載の方法。

【請求項76】 請求項73に記載の方法であって、前記比較する工程が、前記ミトコンドリアDNAに対する前記プライマーのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下および時間で、該増幅されたミトコンドリアDNAに存在する配列に相補的であるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと、増幅されたミトコンドリアDNAを含むサンプルを接触させることによって、ミトコンドリアDNAを測定する、工程；ならびに、該ミトコンドリアDNAに対する該プライマーのハイブリダイゼーションを検出する工程であって、検出によって該ミトコンドリアDNAを定量する、工程、を包含する、方法。

【請求項77】 前記検出する工程が、ポリメラーゼ連鎖反応、オリゴヌクレオチドプライマー伸長アッセイ、リガーゼ連鎖反応、および制限フラグメント長多型分析からなる群から選択される技術を含む、請求項76に記載の方法。

【請求項78】 前記ミトコンドリアDNAが、ポリメラーゼ連鎖反応、転写増幅系および自己持続性配列複製からなる群から選択される技術を使用して増幅される、請求項76に記載の方法。

【請求項79】 請求項73に記載の方法であって、前記比較する工程が、前記ミトコンドリアDNAに対する前記プライマーのハイブリダイゼーションを

可能にするのに十分な条件下および時間で、該ミトコンドリアDNAに存在する配列に相補的であるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと、ミトコンドリアDNAを含む生物学的サンプルとを接触させることによって、ミトコンドリアDNAを測定する、工程；ならびに、該ミトコンドリアDNAに対する該プライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長を検出して、産物を産生する工程であって、検出によって該ミトコンドリアDNAを定量する、工程、を包含する、方法。

【請求項80】 請求項73に記載の方法であって、前記比較する工程が、前記ミトコンドリアDNAに対する前記プライマーのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下および時間で、該増幅されたミトコンドリアDNAに存在する配列に相補的であるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと、増幅されたミトコンドリアDNAとを含むサンプルを接触させることによって、ミトコンドリアDNAを測定する、工程；ならびに、該ミトコンドリアDNAに対する該プライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長を検出し、産物を生成する工程であって、検出によって該ミトコンドリアDNAを定量する、工程、を包含する、方法。

【請求項81】 前記ミトコンドリアDNAが、ポリメラーゼ連鎖反応、転写増幅系および自己持続性配列複製からなる群から選択される技術を使用して増幅される、請求項80に記載の方法。

【請求項82】 前記サンプルにおけるミトコンドリアDNAの量が、オリゴヌクレオチドプライマー伸長アッセイを使用して決定される、請求項73に記載の方法。

【請求項83】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、フリーラジカル生成である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項84】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、反応性酸素種、タンパク質ニトロシル化、タンパク質カルボニル修飾、DNA酸化、mtDNA酸化、タンパク質酸化、タンパク質カルボニル修飾、タンパク質のマロンジ

アルデヒド付加物、糖酸化産物、脂質酸化産物、8'-OH-グアノシン付加物およびTBARSからなる群から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項85】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が反応性酸素種である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項86】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標がタンパク質ニトロシル化である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項87】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標がDNA酸化である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項88】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標がミトコンドリアDNA酸化である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項89】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標がタンパク質カルボニル修飾である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項90】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性応答である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項91】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、少なくとも1つのアポトーシス誘導因子に対する細胞性応答である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項92】 変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標の正常なレベルまで実質的に回復させる薬剤を該患者に投与する工程を包含する、関節炎障害を有するヒト患者を処置するための方法。

【請求項93】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、ミトコンドリア電子伝達系酵素、クレブス回路酵素、ミトコンドリアマトリックス成分、ミトコンドリア膜成分およびATP生合成因子からなる群から選択される、請求項92に記載の方法。

【請求項94】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、1つの細胞あたりのミトコンドリア数および1つの細胞あたりのミトコンドリア質量からなる群から選択される、請求項93に記載の方法。

【請求項95】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標がATP生成因子である、請求項93に記載の方法。

【請求項96】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、1つのミトコンドリアあたりのATPの量、ミトコンドリア質量の1単位あたりのATPの量、1単位のタンパク質あたりのATPの量および1単位のミトコンドリアタンパク質あたりのATPの量からなる群から選択される、請求項92に記載の方法。

【請求項97】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標がラジカル生成を包含する、請求項92に記載の方法。

【請求項98】 前記変更されたミトコンドリア機能の指標が、上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性応答を含む、請求項92に記載の方法。

【請求項99】 前記変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標が、変更されたミトコンドリア機能の同時予測指標である、請求項92に記載の方法。

【請求項100】 前記変更されたミトコンドリア機能の同時予測指標が、該患者における1つの細胞あたりのミトコンドリアDNAの量である、請求項99に記載の方法。

【請求項101】 ミトコンドリア機能を変更する薬剤の有効量を投与する工程を包含する、関節炎障害を処置するための方法。

【請求項102】 前記薬剤がミトコンドリア保護剤である、請求項101に記載の方法。

【請求項103】 前記薬剤が抗酸化剤である、請求項101に記載の方法。

【請求項104】 脊椎動物被験体由来の生物学的サンプル中の関節炎障害の危険性を同定するためか、脊椎動物被験体由来の生物学的サンプル中の関節炎障害の疾患進行の程度を決定するためか、または脊椎動物被験体由来の生物学的サンプル中の関節炎障害のサブタイプに従う脊椎動物種の被験体を層別化するためのキットであって、該キットは、以下を含む：

a) 請求項1、2、6または7のいずれか1項に記載の方法に従って、変更され

たミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを検出可能である、少なくとも1つの試薬；および

b) 該指標を検出する際の使用に適した補助的な試薬。

【請求項105】 合成軟骨パッチを調製する方法であって、該方法は、以下の工程：

サイブリッド軟骨細胞を産生するために、関節炎障害を有する第1の患者由来の軟骨細胞に異種ミトコンドリアDNAを導入する工程であって、該外因性ミトコンドリアDNAが、関節炎障害を有することが公知でない第2の患者由来である工程；ならびに、該軟骨細胞が細胞外マトリックスを同化するのを可能にするのに十分な条件下および時間で、該サイブリッドを培養する工程、を包含する、方法。

【請求項106】 合成軟骨パッチを調製する方法であって、該方法は、以下の工程：

該軟骨細胞が細胞外マトリックスを同化するのを可能にするのに十分な条件下および時間で、少なくとも1つのミトコンドリア保護剤の存在下で、関節炎障害を有する被験体由来の軟骨細胞を培養する工程、を包含する、方法。

【請求項107】 前記軟骨細胞が、抗酸化剤である少なくとも1つのミトコンドリア保護剤の存在下で培養される、請求項106に記載の方法。

【請求項108】 合成軟骨パッチを調製する方法であって、該方法は、以下の工程：

関節炎障害を有する被験体由来の軟骨の選択されていない集団から増強されたミトコンドリア機能を有する軟骨細胞の亜集団を選択する工程；ならびに、該軟骨細胞を細胞外マトリックスに同化するのを可能にするのに十分な条件下および時間で、該軟骨の亜集団を培養する工程、を包含する、方法。

【請求項109】 請求項105、106または108のいずれか1項に記載の方法によって産生された、合成軟骨パッチ。

【請求項110】 被験体における所定の部位の軟骨欠損を修復する方法で

あって、該所定の部位で、請求項109に記載の合成軟骨パッチを外科的に移植する工程を包含する、方法。

【請求項111】 前記患者に対する1つ以上のミトコンドリア保護剤を投与する工程をさらに包含する、請求項110に記載の方法。

【請求項112】 前記1つ以上のミトコンドリア保護剤が、少なくとも1つの抗酸化剤を含む、請求項111に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、関節炎および関連する障害に一般的に関する。特に、本発明は、骨関節症および慢性関節リウマチの診断、予後判定および処置のため、ならびに骨の喪失を予防するための組成物および方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

脊椎動物における骨格系の非常に多くの慢性の衰弱化疾患（関節炎および関連する関節炎障害を含む）は、関節軟骨として公知の特殊化した無血管の軟骨性組織の崩壊を特色とし、この関節軟骨は、専用の軟骨産生細胞、すなわち関節軟骨細胞（articular chondrocyte）を含む。以下により詳細に記載されるように、成長する長骨端に存在する骨端軟骨板の軟骨細胞のような他の軟骨細胞（例えば、軟骨内性軟骨細胞または肋骨軟骨性軟骨細胞）とは異なり、関節軟骨細胞は、脈管構造を有さない関節軟骨に存在し、そしてこの関節軟骨を維持する。従って、酸素供給源としての血液供給を欠如するので、関節軟骨細胞は、主に嫌気性（例えば、解糖的）呼吸によって（そして、好気性のミトコンドリア酸化的リン酸化からではない）、代謝エネルギー（例えば、生物エネルギー論的ATP産生）を産生すると考えられる（Stefanovich - Racicら、1994 J. Cell Physiol. 159:274-280）。好気性条件下でさえも、関節軟骨細胞は少しの酸素を消費し得、それ故広範な種々の脊椎動物細胞型とは異なるようなので（Stefanovicheh - Racicら、1994）、関節炎障害におけるミトコンドリアの役割は、ほとんど無視されてきた。

【0003】

(I. 筋骨格関節の構造および機能)

進化は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、爬虫類、鳥類および魚類）における運動の生成および制御に特別に効率よい筋骨格系を発達させた。従って、この筋骨格系は、有用な機械的エネルギーおよび負荷支持を効率的に送達するが、また、

複雑な高分子を合成、プロセスおよび組織化して、特定の機械的機能の実行に特殊化した組織および器官を形成し得る。関節は、筋骨格系の特殊化構造の重要な部分集合であり、そして多くの異なる型の関節が体内に存在する。自由に動く関節（例えば、足関節、肘、股関節部、膝関節（knee）、肩甲関節ならびに手指、足指および手首の関節）は、可動関節性関節または滑液関節として公知である。対照的に、脊椎の椎間関節は、繊維質かつ自由に動かないので、可動関節性関節ではないが、脊椎によって必要とされる柔軟性は提供する。

【0004】

可動関節性関節は、いくつかの共通の構造特徴を有する。第一に、すべての可動関節性関節は、強靱な線維性包に囲まれる。第二に、関節包の内部表面は、代謝に活性な組織である滑膜で補強され、この滑膜は、関節を滑らかにし、そして無血管性軟骨によって必要とされる養分を提供する滑液を分泌する。第三に、関節における関節でつながった骨端は、関節軟骨として公知の水和した柔軟な組織の薄層で補強される。第四に、関節は、関節包の内部または外部に存在し得る靱帯および腱によって安定化され、そしてその動く範囲は、この靱帯および腱によって制御される。

【0005】

可動関節性関節の表面内層（すなわち、滑膜および関節軟骨層）は、滑液を含む関節腔を形成する。従って、脊椎動物の骨格関節において、滑液、関節軟骨および支持骨は、滑らかでほとんど摩擦のない軸受システムを形成する。可動関節性関節は、莫大かつ種々の範囲の負荷条件に供されるが、軟骨表面は、正常な環境下で、摩損および引き裂き（例えば、構造的崩壊）をほとんど受けない。実際に、大半のヒト関節は、非常に高い負荷および圧力下、ならびに非常に遅い作動速度で有効に機能し得る。これらの性能特徴は、有効な潤滑プロセスを必要とし、関節における軟骨の摩擦および摩損を最小限にする。生化学的および/または生体力学的プロセスによる関節軟骨のひどい故障は関節炎を導き、従ってこの関節炎は、一般的に、脊椎動物の重量軸受システムの故障として規定される。

【0006】

硝子軟骨は、その名称が意味するように、外観上は硝子のようになめらかで（

glass-smooth) ピカピカ光り、そして青みをおびた白色であるが、より古びたまたは疾患性の組織は、この外観を失う傾向にある。最も一般的な硝子軟骨および最も研究された硝子軟骨は、関節軟骨であり、これは、可動関節性関節内部の長骨の骨およびsiesamoid骨の関節表面を覆う。上記のように、関節軟骨は、関節軟骨細胞として公知の特殊化軟骨細胞、ならびに主として2つの主要なクラスの高分子(コラーゲンおよびプロテオグリカン)を含む軟骨性細胞外マトリックスからなる。関節軟骨細胞は、3次元細胞外マトリックスを合成、沈積および滞留し、そしてまた、滑液(これは、関節軟骨を浸す)に存在するいくつかの溶質および酵素を合成する。健康な関節軟骨は、関節の骨端間の滑らかな表面を形成し、運動によって引き起こされる摩擦を減少する。滑液は、この摩擦をさらに減少する。

【0007】

軟骨の発生(軟骨発生(chondrogenesis))の間に、間充細胞由来の軟骨芽細胞は、窩として公知の小腔またはくぼみに閉じこめられるようになり、ここで、この軟骨芽細胞は、関節軟骨細胞に発生し、この関節軟骨細胞は、軟骨芽細胞と対照的に、自己複製能力が制限される。しかし、関節軟骨細胞は、軟骨の細胞外マトリックス(ECMまたは単に「マトリックス」)を含む高分子の合成、会合、分解および回転(turnover)を媒介する。このマトリックスの機械化学的性質は、インビボで軟骨の生体力学的機能に有意に寄与する。関節軟骨は、脈管組織ではないので、関節軟骨細胞は、低酸素緊張の環境下に存在すると考えられ、従って、嫌気性(例えば、解糖的)のATP生合成によって、代謝エネルギーを優先的に駆動するようであり得る(Stefanovich-Racicら、1994)。

【0008】

関節軟骨の構造全体性は、骨格関節(例えば、脊椎動物の股関節部、肩甲関節、肘、膝(hock)および膝関節(stifle)において見出される関節)の最適機能の基礎である。損なわれた骨格関節機能は、個々の被験体の可動性(例えば、着座位置からの起立または階段の昇降に關与する可動性)を劇的に減少する。上記のように、関節軟骨の構造的および機能的全体性を維持するために、

関節軟骨細胞は、コラーゲンおよびプロテオグリカン（関節軟骨の主要な成分）を常に合成する；軟骨細胞はまた、摩擦を減少する滑液を分泌する。軟骨のECM高分子および滑液の関節軟骨細胞によるこの一定の同化は、関節軟骨に大半の機械的摩損についての修復機構を提供し、この摩損は、骨端間の摩擦によって引き起こされ得る。しかし、軟骨成分のこのような安定した生合成は、これらの高分子および滑液成分の前駆体、すなわち基礎単位についての一定の要求を生成する。これらの前駆体の欠如は、骨格関節の構造および機能における欠陥を導く。この欠陥は、しばしば、活性レベルが非常に高いか、または軟骨組織が傷つけられた場合に生じる。

【0009】

膝関節の半月および他の類似の構造（例えば、顎関節円板および肩甲関節唇）は、正常な関節機能にきわめて重大な特殊化線維軟骨性構造である。これらは、関節を横切った負荷の分配において関節軟骨を助け、関節の安定化において靱帯および腱を助け、そして衝撃吸収における主要な役割を果たすことが公知であり、そして関節の潤滑化をさらに助け得る。これらの構造に対する損傷は、損なわれた関節機能および関節軟骨の変性を導き得る。これらの線維軟骨性構造の外科的除去（例えば、明らかに回復不可能な軟骨の摩損後に）は、骨関節症の早期発症をもたらす得る。半月、円板および唇は、主としてII型コラーゲンを含む線維軟骨構造を水和し、少量の他のコラーゲンおよびプロテオグリカン（アグリカンおよび小さな非凝集性プロテオグリカンを含む）もまた存在する。これらの線維軟骨性構造は、常在性（resident）細胞の散在した集団を含み、この細胞は、軟骨の関節軟骨細胞のように、この細胞外マトリックスの合成および維持を担う。

【0010】

（II．関節炎障害）

可動関節性関節は、一般の身体運動（モーター（例えば、歩行）機能に関連した肢の運動および日常生活の他の行動を含む）を可能にする。これらの関節は、代表的には、その機能を非常に良好かつ有効に行い、その存在は、損傷が攻撃するか、または関節炎が発症するまで無害であり得る。工学の見地から、これらの

天然の生体力学的軸受は、非常にまれな構造である。健康な関節は、寿命のすべてまたは寿命の大半を通して事実上摩擦がなく、そして摩損耐性様式で機能し得る。機械的に操作された人工軸受のように、関節の軸受表面（すなわち、関節軟骨）の故障は、その中枢機能（例えば、機械エネルギーおよび負荷支持の送達）を提供するこれらの軸受の故障を意味する。

【0011】

生物医学用語において、可動関節性関節の故障は、関節炎障害を導き、この最も一般の形態は、骨関節症または変形性関節症あるいは軟骨石灰化症である。関節炎障害の他の形態としては、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節炎、紅斑性狼瘡、痛風および感染性関節炎が挙げられるがこれらに限定されない（例えば、Gillilandら、「Disorders of the joints and connective tissue」、第14節、Harrison's Principles of Internal Medicine、第8版、Thornら、編、McGraw-Hill、New York、NY、1977、2048～2080頁）を参照のこと）。関節炎障害はまた、関節損傷をもたらす身体的外傷（例えば、関節組織を傷つける急性の身体的損傷または反復動作性症候群）あるいは食餌状態（例えば、リケッチア感染症（ricketts）または他の食餌欠乏性疾患）を含み得るかまたはこれらに由来し得る。

【0012】

はるかに、最も流行している関節炎障害は、慢性関節リウマチ（RA）および骨関節症（OA）である。RA（これは、自己免疫障害と考えられている）は、部分的に、滑膜の炎症に由来する。ヒトにおいて、この障害のピーク発症は、30歳を超えた成人（代表的には、30代および40代）において生じ、そして男性よりも3倍の頻度で女性を冒す。極端な場合においては、慢性の炎症は、関節表面および結合組織を腐食およびゆがめ、重篤な関節変形および不断の疼痛をもたらす。さらに、RAは、しばしばOAを導き、関節の破壊をさらにいっそうひどくする。最も一般的な関節炎障害であるOAは、関節軟骨表面における変性変化によって特徴付けられる。軟骨の物理化学的構造における変異は、圧縮力およ

び張力に対する耐性を弱くする。最終的に、完全な腐食が起こり、軟骨下の骨を曝露したままにし、そして摩損を受けやすくする。膝および手の関節は、最もしばしば冒され、1つ以上の脊椎、股関節部、足関節および肩甲関節もまた同様であり得る。RAおよびOAの両方において、重量軸受関節（例えば、股関節部および膝関節）の変性は特に衰弱し得、そしてしばしば手術を必要として、疼痛を軽減し、そして可動性を増大する。

【0013】

RAによって引き起こされる変性変化および関連する関節炎障害を休止させるかまたは逆転させるための手段は、現在存在しない。同時に、約3700万人のアメリカ人が、医師の処方箋がなければ入手できない薬物の形態で、徴候的な軽減を求めている。このような場合、非ステロイド性抗炎症薬物（NSAIDs）が最もしばしば処方される。これらの化合物は、しばしば関節炎の症状を緩和または軽減するが、しばしば所望されない副作用（例えば、吐き気および胃腸の潰瘍）を有する。関節炎障害の処置のために一般に処方される他の化合物は、コルチコイド（例えば、トリアムシノロン、プレドニゾロンおよびヒドロコルチゾン）である。これらの薬物はまた、特に長期間の使用が必要とされ得る場合に、所望されない副作用を有し、そのため、多くの患者において禁忌を示し得る。有効な投薬量決定の難しさに加えて、多くの有害な反応が、これらのステロイドおよび他のステロイドを用いた関節内処置の間に報告されている。結果として、関節炎障害の治療技術におけるコルチコイド処置の使用は、現在再評価されている。

【0014】

上記のようなOAおよびRAを処置するための徴候的測定および軽減測定の代替として、関節炎の関節の機械的修復は、可能な場合には整形外科手術を必要とし、すりきれた関節を人工のプロテーゼまたは生物学的移植片で置換する。3000万人を超えるアメリカ人が、これらの損傷（disabling）疾患に罹患し、このような手術は、莫大な医学的および経済的難題を提起し、そしてそのものの危険性および禁忌なしには存在しない。

【0015】

骨関節症（また、変形性関節症としても公知）は、最も一般の型の関節炎のう

ちの1つである。これは、関節内部の軟骨の故障によって特徴付けられ、関節の一方の骨の別の骨に対する疼痛を伴う摩擦を引き起こし、そして罹患した関節内部の運動の喪失を導く。骨関節症は、非常に軽度から非常に重篤な範囲にわたり得、そして中年および高齢者が最も一般に罹患する。特に、OAはしばしば、手ならびに重量軸受関節（例えば、膝関節、股関節部、足および背）を冒す。年齢は主要な危険因子であるが、現在、この状態の病因および病原は、主として未知のままである。多くの環境因子および他の独立した状態は、骨関節症を有するかまたは発症する危険性の増加に関連し、これは、肥満、以前の損傷および/または半月板切除術（例えば、スポーツ関連損傷もしくは他の不慮の損傷）、繰り返された膝関節の曲げを伴う業務関連行動、喫煙、性ホルモン、婦人科障害ならびに他の代謝因子を含む。軟骨石灰化症は、骨関節症に関連した変形性関節症の別の形態であり、異常な石灰沈着が、関節軟骨において生じる。

【0016】

現在、骨関節症の正確な診断は、疾患が有意に進行した場合にのみ、一般的に可能である。医師は、身体検査および症状の経歴に基づいて、骨関節症の診断をほとんど下せるも同然であり得る。X線による検査は、診断を確認するためだけに代表的に使用される。最近の研究は、太りすぎの中年の人々の体重喪失が、有意に危険性を減少し得るか、または膝関節の骨関節症の発症を妨げさえし得ると結論を下した。このような場合において、骨関節症の発症に対する個人の素因の診断における精度の改良は、明確な利点を提供する。

【0017】

従って、本明細書中に提供されるように、本発明の特定の実施形態は、関節炎および関連する障害の診断のための組成物および方法を導く。関連する実施形態において、本発明は、好ましくは、当該分野で公知または本明細書中の開示に基づいて後に開発されたようなハイスループットのスクリーニング方法を使用して、このような障害を処置するために使用され得る組成物、およびこのような化合物についてのスクリーニング方法を提供する。このような処置は、事実上、改善的、治療的、軽減的、回復的、予防的、防御的または予防的であり得る。

【0018】

(I I I . イヌ股関節形成不全および非ヒト動物における他の障害)

特定の実施形態において、本発明は、イヌ股関節形成不全に罹患したイヌの早期診断のための組成物および方法に関する。関連する実施形態において、本発明は、部分的に、他の非ヒト動物における関節炎、形成異常症ならびに関連する疾患および障害の診断のための組成物および方法に係る。

【 0 0 1 9 】

イヌ股関節形成不全は、米国だけでも無数のイヌが罹患する一般的な整形外科的疾患である。イヌ股関節形成不全は、多くの品種のイヌが罹患するが、より大きな品種において、特に高い発病率である。80を超える罹患したイヌの品種としては、ジャーマンシェパード、ニューファンドランド、オールドイングリッシュシープドッグ、イングリッシュブルドッグ、ラブラドルレトリバー、他のレトリバー種、アイリッシュセッター、グレートデーンおよびセントバーナードが挙げられる。この疾患は、股関節部関節の弛緩および不適合によって特徴付けられ、これは、関節組織の変性をもたらす。骨関節症は、弛緩に起因した関節に関して、大腿頭部の異常な位置の結果として発症し、そして関節軟骨の腐食および滑膜の炎症をもたらす。形成異常の股関節部関節における骨関節症のイヌにおける発症は、イヌ股関節形成不全のベンチマークサインである。

【 0 0 2 0 】

イヌ股関節形成不全は、複雑な遺伝的および環境的ベースの遺伝性疾患であると考えられる。臨床症状は、股関節部関節の軽度の不快から重篤な衰弱の範囲にわたり、そしてこの疾患は、後方の肢および関節における脚の不自由さの最も一般的な原因である。しかし、たいいていの場合、形成異常症の臨床症状は、罹患したイヌの寿命末期およびこの疾患プロセスの開始から長期間経って現れ、これは、6ヶ月～12ヶ月の間に始まり得る。イヌ股関節形成不全の早期診断（例えば、1歳未満での）は、例えば、イヌの飼育者が、罹患したイヌを飼育プログラムから除くために、若い年齢で罹患したイヌを正確に同定することを可能にするに所望かつ有用である。早期診断はまた、疾患進行が促進し得る前の処置を可能にし得る。例えば、身体活動および食餌療法を介した罹患したイヌの体重管理が開始され、股関節部関節における負担を制限し得る。あるいは、生体適合性骨伝導

性ポリマー (B i o c o m p a t i b l e O s t e o c o n d u c t i v e P o l y m e r) (B O P) シェルフ (s h e l f) 関節形成術 (これは、ポリマーが使用され、亜脱臼を予防するために形成異常症のイヌの欠陥のある股関節部を再構築する外科的手順) が選られ得る。

【0021】

米国特許第5,482,055号に開示される股関節部形成異常症の検出についての最新の方法は、圧迫-牽引圧力ラジオグラフィーに基づく。この方法は、骨関節症の存在または非存在に関連した関節弛緩を測定する (S m i t h ら、1993 Am. J. Vet. Res. 54:1021-42; S m i t h ら、1990 J. Am. Vet. Med. Assoc. 196:59-70)。この圧力方法は、受動弛緩を引き出し、この弛緩は、力が股関節部関節を散らすために使用される場合に生じる大腿頭部の最大の側面移動である。調節可能なデバイスである「牽引器 (d i s t r a c t o r) 」を使用して、受動弛緩を明らかにし、そして「牽引指標」と呼ばれる測定値によって、大腿頭部の側面移動を定量する。この指標は、受動弛緩の基準および予測値として使用され、ここで、一定の値未満では、イヌは骨関節症を発症しないようである。例えば、ラブラドルレトリバーにおいては、0.3の牽引指標は、堅い股関節部関節を示し、そして0.7を超える牽引指標は、緩い股関節部関節 (受動弛緩) を示す。従って、牽引指標が0.3から0.7に増加するにつれて、骨関節症を発症する確率も増加する。しかし、この範囲の牽引指標を有するラブラドルレトリバーについての結果が確実に予測できない点で、問題が生じる (S m i t h ら、1993、前出; L u s t ら、1993 Am. J. Vet. Res. 54:1990-9)。有望な原因としては、股関節部関節構造の他の成分 (例えば、寛骨臼および大腿の頭部構造) が挙げられ、これらの構造は、機能的な関節安定性に寄与し、そして移動の間の股関節部亜脱臼への受動弛緩の媒介程度の転換を妨げる。

【0022】

(I V . ミトコンドリア)

上記のように、脊椎動物の関節軟骨細胞における代謝エネルギーの産生が、嫌気性呼吸 (例えば、解糖的 A T P 合成) を介して進行すると考えられるので、ミ

トコンドリアの酸化的リン酸化と関節炎障害との間の関係に、ほとんどまたはまったく注意が払われてこなかった。背景として、ミトコンドリアは、高等生物の細胞における主要なエネルギー源であり、そして広範なアレイの細胞呼吸プロセス、酸化プロセスおよび代謝プロセスの直接的および間接的な生化学的調節を提供する。このようなプロセスとしては、電子伝達系（ETC）活性が挙げられ、この活性は、酸化的リン酸化を駆動して、アデノシン3リン酸（ATP）の形態で代謝エネルギーを産生し、そしてまた、細胞内カルシウムホメオスタシスにおける中心的なミトコンドリアの役割に応ずる。

【0023】

ミトコンドリアの超微細構造の特徴付けは、細胞小器官と細胞質ゾルとの間の界面として働くミトコンドリア外膜の存在、複数の部位で外膜への接着を形成するように高度に折り畳まれたミトコンドリア内膜の存在、およびこの2つのミトコンドリア膜の間の膜間腔の存在を明らかにする。ミトコンドリア内膜内部の亜区画は、ミトコンドリアマトリックスと一般にいわれる（概説については、例えば、Ernsterら、1981 J. Cell Biol. 91:227sを参照のこと）。クリステ（これは、ミトコンドリア内膜の陥入として生じると本来仮定された）は、最近、3次元電子断層撮影法を使用して、管様導管を含むとしても特徴付けられ、この導管は、ネットワークを形成し得、そして開いた環状の（直径30nm）接合点によって、内膜に接続され得る（Perkinsら、1997、Journal of Structural Biology 119:260）。外膜は、約10キロダルトン未満の分子量を有するイオン性溶質および非イオン性溶質を自由に透過し得るが、ミトコンドリア内膜は、多くの低分子（特定の陽イオンを含む）に対する選択的かつ調節された透過性を示し、そして高分子（約10kDaを超える）に対して不透過性である。

【0024】

変更されたかまたは欠陥のあるミトコンドリア活性（ETCの任意の段階での故障を含むがこれに限定されない）は、悲劇的なミトコンドリアの破壊をもたらし得、この破壊は、「透過性移行（permeability transition）」（PT）または「ミトコンドリア透過性移行」（MPT）と呼ばれて

いる。一般的に受け入れられたミトコンドリア機能の理論に従って、適切なETC呼吸活性は、結合した(coupled)化学浸透圧機構によるミトコンドリア内膜における電気化学的電位($\Delta\psi_m$)の維持を必要とする。変更されたかまたは欠陥のあるミトコンドリア活性は、この膜電位を放散し得、それによって、ATP生合成を妨げ、そして致命的な生化学的エネルギー源の産生を停止する。さらに、ミトコンドリアタンパク質(例えば、シトクロームcまたは膜間腔タンパク質)は、透過性移行後にミトコンドリアの中から漏れ得、そしてアポトーシスまたはプログラム細胞死(PCD)として公知の、遺伝的にプログラムされた細胞自殺の結果を誘導し得る。

【0025】

ETC活性を媒介する5つのマルチサブユニットタンパク質複合体のうちの4つ(複合体I、III、IVおよびV)は、ミトコンドリア内膜に局在し、この内膜は、細胞において最もタンパク質に富む(75重量%)生物学的膜である；残りのETC複合体(複合体II)は、マトリックスに位置する。ETC内部で生じることが公知の少なくとも3つの異なる化学反応において、正に荷電したプロトンは、ミトコンドリアマトリックスから、内膜を横切って膜間腔に移動する。この荷電種の不均衡は、「プロトン駆動力」(PMF)といわれる約220mVの電気化学的電位を引き起こし、このプロトン駆動力は、しばしば $\Delta\psi$ または $\Delta\psi_m$ という表記によって表され、そしてミトコンドリア内膜を横切った電気電位およびpH差の合計を表す(例えば、Ernst et al., 1981, J. Cell Biol. 91:227sおよびそれに引用される参考文献を参照のこと)。

【0026】

この膜電位は、アデノシン2リン酸(ADP)がリン酸化されて、ETC複合体VによってATPを生じる場合に産生されるリン酸結合に寄与するエネルギーを提供し、これは、マトリックスへのプロトン輸送に化学量論的に「共役した」プロセスである； $\Delta\psi_m$ はまた、ミトコンドリアへの細胞質ゾル Ca^{2+} の流入についての駆動力である。正常な代謝条件下において、内膜は、膜間腔からマトリックスへのプロトン移動に対してほぼ不透過性であり、ETC複合体Vを第一の

手段として残し、これによって、プロトンは、マトリックスに戻り得る。しかし、ミトコンドリア内膜の統合性が損なわれると、変更されたミトコンドリア機能に関連した疾患を付随し得るMPTの間に生じるように、プロトンは、ATPの産生なしに複合体Vの導管を迂回し得、それによって、呼吸を「脱共役する(uncoupling)」。なぜなら、電子伝達および関連するプロトンポンピングは、ATPを生じないからである。従って、ミトコンドリア透過性移行は、ミトコンドリア膜「孔」の開放に関与し、これはとりわけ、ETCおよび $\Delta\psi_m$ が脱共役し、 $\Delta\psi_m$ が崩壊し、そしてミトコンドリア膜が低分子(例えば、イオン性 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 H^+)および高分子(例えば、タンパク質)の両方の溶質に対する透過性を選択的に調節する能力を失うプロセスである。

【0027】

ミトコンドリアの透過性移行「孔」は、別個のアセンブリまたはマルチサブユニットの複合体ではないかもしれず、従って、この用語は、代わりに、内膜の選択的透過性を調節する任意のミトコンドリアの分子成分(例えば、ミトコンドリア膜それ自体を含む)をいい、ここで、このような調節された機能は、MPTの間に損なわれる。ミトコンドリアの分子成分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸もしくはそれらの誘導体；脂質、脂肪酸などもしくはそれらの誘導体；炭水化物、糖類などもしくはそれらの誘導体；核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジンもしくは関連する分子、またはそれらの誘導体など；あるいはミトコンドリアの構成要素である任意の他の生物学的分子であり得る。ミトコンドリアの孔成分は、上記のようなミトコンドリア膜の選択的透過性特徴を調節する任意のミトコンドリア分子成分であり得、 $\Delta\psi_m$ の確立を担う成分およびMPTの間に機能的に改変される成分を含む。

【0028】

理論により束縛されるのを望まないが、この孔が、例えば、特定のミトコンドリアタンパク質および/もしくは細胞質ゾルタンパク質ならびにおそらく他の分子種のアセンブリもしくは凝集によってミトコンドリア膜に形成される物理学的に異なる導管であるか否か、またはこの「孔」の開放が、ミトコンドリア膜の多孔性における一般的な増加を単に示し得るか否かは未解決である。少なくとも、

特定のミトコンドリア分子成分は、MPT機構に寄与し得、これは、ETC成分または本明細書中に記載される他のミトコンドリア成分を含む。例えば、MPT機構に寄与するようなミトコンドリアタンパク質またはミトコンドリア関連タンパク質のいくつかの非限定的な例としては、電位依存性陰イオンチャネル(VDAC、ポーリンとしてもまた公知である)ファミリータンパク質のメンバー、ミトコンドリアカルシウムユニporter、ミトコンドリア関連ヘキソキナーゼ、末梢ベンゾジアゼピンレセプターおよび膜間クレアチンキナーゼが挙げられる。

【0029】

MPTは、ミトコンドリア遺伝子、ミトコンドリア遺伝子産物もしくはミトコンドリアの下流のメディエータ分子および/またはミトコンドリア外遺伝子、ミトコンドリア外遺伝子産物もしくはミトコンドリア外の下流のメディエータの直接的または間接的効果に由来し得る。MPTはまた、他の既知または未知の原因に由来し得る。ミトコンドリア電位の喪失は、変更されたミトコンドリア機能に関連する疾患(変性疾患を含む)の進行における重要な事象であり得る。

【0030】

ミトコンドリアの欠陥は、変更されたミトコンドリア機能に関連した疾患の病因に有意に寄与し得る。このような欠陥は、ミトコンドリアDNAに存在する別個のミトコンドリアゲノムおよび/またはミトコンドリア外ゲノムに関連し得、ミトコンドリア外ゲノムは、核染色体DNAおよび他のミトコンドリア外DNAを含む。例えば、ミトコンドリア成分の構造的性質および/または機能的性質における変更(遺伝的因子および/もしくは環境的因子に由来する変更、または細胞補償機構に由来する変更を含む)は、変更されたミトコンドリア機能に関連した任意の疾患の病因における役割を果たし得る。

【0031】

多くの変性疾患は、ミトコンドリア機能における変更(例えば、増加もしくは減少)によって引き起こされるか、またはこの変更に関連すると考えられる。理論によって束縛されるのを望まないないが、このような変更は、包括的であり得、罹患した個体における事実上すべての細胞および組織型においてそれ自身が表れるか、または所定の疾患に特に関連するような特定の細胞もしくは組織型にお

いて、より明らかであり得る。変更されたミトコンドリア機能に関連した疾患としては、神経変性に伴う障害（例えば、アルツハイマー病（AD）；パーキンソン病；ハンチントン病；ジストニー；レーバー遺伝性視神経症；精神分裂病；ミトコンドリア脳障害、乳酸アシドーシスおよび発作（mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke）（MELAS）；ならびにミオクローヌス、癲癇、ぼろぼろの赤色線維症候群（myoclonic epilepsy, ragged red fiber syndrome）（MERRF）、癌）、ならびに他の特殊化組織の変性が存在し得る障害（例えば、乾癬；過増殖性障害；ミトコンドリア糖尿病および難聴（MIDD）；ならびに真性糖尿病）が挙げられる。変更されたミトコンドリア機能に関連したさらなる疾患の広範なリストは、異常なミトコンドリア活性または有糸分裂核（mitonuclear）活性が特定の疾患プロセスに関係するため拡張し続ける。

【0032】

変更されたミトコンドリア機能に関連したADおよび潜在的に他の疾患の特徴的な病因は、特定の罹患した組織における選択された細胞集団の死であり、これは、アポトーシス（また、「プログラム細胞死」またはPCDといわれる）に由来する。ミトコンドリア機能不全は、種々の細胞型におけるアポトーシスを導く事象のカスケードに重要であると考えられる（Kroemerら、FASEB J. 9:1277-87、1995）。変更されたミトコンドリア生理機能は、PCDにおける最も早い事象の中の1つであり得（Zamzamiら、J. Exp. Med. 182:367-77、1995；Zamzamiら、J. Exp. Med. 181:1661-72、1995）、そしてこのような変更されたミトコンドリア機能に由来する上昇した活性酸素種（ROS）レベルは、アポトーシスカスケードを開始し得る（Aussererら、Mol. Cell. Biol. 14:5032-42、1994）。

【0033】

従って、増殖細胞のエネルギー産生における役割に加えて、ミトコンドリア（または、少なくともミトコンドリア成分）は、アポトーシスに関与する（New

meyerら、1994、Cell 79:353-364; Liuら、1996、Cell 86:147-157)。アポトーシスはまた、明らかに、とりわけ特殊化組織の正常な発生（例えば、発生上のプログラムされた組織の再建の間の廃退した細胞の除去）および免疫系の適切な機能に必要とされる。さらに、いくつかの疾患状態は、アポトーシスの不十分なレベル（例えば、癌、自己免疫疾患）または過度のレベル（例えば、発作損傷、AD関連神経変性）のいずれかに関連すると考えられる。アポトーシスおよびそこでのミトコンドリアの役割の一般的な概説については、GreenおよびReed(1998、Science 281:1309-1312)、Green(1998、Cell 94:695-698)ならびにKromer(1997、Nature Medicine 3:614-620)を参照のこと。従って、アポトーシス事象（ミトコンドリア成分に関連した事象を含む）に影響を及ぼす因子は、種々の軽減用途、予防用途および治療用途を有し得る。

【0034】

上記から、現在の薬理的治療はどれも、関節炎障害（例えば、RAおよびOA）において基礎をなす生化学的欠陥を直さないことが明らかである。これらの現在利用可能な処置はいずれもまた、関節炎障害（例えば、異常な関節軟骨細胞活性、軟骨分解、関節腐食および重篤な関節変形）における生理学的異常のすべてを改善するわけではない。さらに、これらの因子を用いた処置の失敗は一般的であり、その結果、多剤治療がしばしば必要とされる。

【0035】

明らかに、変更されたミトコンドリア機能の基礎をなすこのような欠陥が、ミトコンドリア起源またはミトコンドリア外起源を有し得るか否かにかかわらず、関節炎障害の発症についての危険性の早期検出について、ならびにこの疾患をになう生化学的欠陥および/または代謝欠陥を直すために標的化されるより良い治療についての改良された診断方法に対する必要性が存在する。本発明は、変更されたミトコンドリア機能の指標に関連した組成物および方法を提供し、この指標は、関節炎障害の進行の危険性および程度の決定、ならびにこの疾患の処置に有用であり、そして他の関連した利点を提供する。

【0036】

(発明の要旨)

1つの局面において、本発明は、脊椎動物被験体における関節炎障害についての危険性を同定するための方法を提供し、この方法は、被験体由来の生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルをコントロールサンプルと比較する工程を包含し、ここで、この変更されたレベルの指標は、被験体が、関節炎障害を有するかまたは関節炎障害を発症するおそれがあることを示し；そしてこれから、関節炎障害についての危険性を同定する。

【0037】

本発明の別の局面は、関節炎障害を有する脊椎動物被験体における疾患進行の程度を決定するための方法を提供することであり、この方法は、第一および第二の生物学的サンプルの各々における変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含し、この第一および第二の生物学的サンプルは、それぞれ第一の時点および第二の時点で被験体から得られ、ここで、この第一および第二の時点の間の変更されたレベルの指標は、疾患の進行を示し；そしてこれから、関節炎障害の進行の程度を決定する。

【0038】

なお別の局面において、本発明は、関節炎障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置するに適切な因子を同定する方法を提供し、この方法は、候補因子の存在下および非存在下において被験体から得られた1つ以上の生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含し、ここで、この変更されたレベルの指標は、この因子がミトコンドリア機能を変更したことを示し；そしてこれから、関節炎障害の処置についての候補因子の適合性を決定する。

【0039】

別の局面において、本発明は、関節炎障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置するための因子の適合性を決定する方法を提供し、この方法は、候補因子を被験体に投与する前および後に、被験体から得られた生物学的サ

ンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含し、ここで、この変更されたレベルの指標は、この因子がミトコンドリア機能を変更したことを示し；そしてこれから、関節炎障害の処置についての候補因子の適合性を決定する。

【0040】

本発明の別の局面は、関節炎障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置するための因子の適合性を決定する方法を提供することであり、この方法は、候補因子を各々の被験体に投与する前および後に、複数の被験体から得られた少なくとも1つの生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含し、ここで、この変更されたレベルの指標は、この因子がミトコンドリア機能を変更したことを示し；そしてこれから、関節炎障害の処置についての候補因子の適合性を決定する。

【0041】

なお別の局面において、本発明は、関節炎障害のサブタイプに従って脊椎動物種の被験体を階層化する方法を提供し、この方法は、複数の被験体種の各々から得られた少なくとも1つの生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含し；そしてこれから、関節炎障害のサブタイプに従って被験体を階層化する。

【0042】

別の局面において、本発明は、関節炎障害のサブタイプに従って脊椎動物種の被験体を階層化する方法を提供し、この方法は、候補因子を各々の被験体に投与する前および後に、複数の被験体種の各々から得られた生物学的サンプルにおける変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含し、ここで、この変更されたレベルの指標は、この因子がミトコンドリア機能を変更したことを示し；そしてこれから、関節炎障害のサブタイプに従って被験体を階層化する。

【0043】

本発明の上述の局面の特定の実施形態において、脊椎動物被験体は、ヒト、イヌ、ウシ、ブタ、ネコ、ウマ、ヤギまたはヒツジであり、そして1つの特に好ま

しい実施形態において、この脊椎動物被験体はヒトである。特定の他の実施形態において、関節炎障害は、骨関節症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、軟骨石灰化症、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節炎、形成異常症、紅斑性狼瘡、痛風または感染性関節炎である。

【0044】

特定の実施形態において、この生物学的サンプルは、軟骨細胞または造血細胞を含み、そして特定のさらなる実施形態において、この軟骨細胞は、関節軟骨細胞であり、一方、特定の他のさらなる実施形態において、この造血細胞は、血小板または有核 (nucleated) 末梢血球であり、これは、特定のなおさらなる実施形態において、リンパ球、単球または顆粒球である。いくつかの実施形態において、この生物学的サンプルは、関節軟骨細胞を含み、そしてこの比較行為は、トランスフォーミング増殖因子 β の非存在および存在下で、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含する。さらなる実施形態において、この変更されたミトコンドリア活性の指標は、ヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼ (pyrophosphohydrolase) である。特定の実施形態において、この生物学的サンプルは、軟骨細胞由来のマトリックス小胞を含み、そしてこの変更されたミトコンドリア機能の指標は、ピロリン酸、ATPまたはヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼである。別の実施形態において、この生物学的サンプルは、軟骨細胞を含み、そしてこの変更されたミトコンドリア機能の指標は、軟骨細胞による、少なくとも1つの細胞外マトリックス成分の同化である。さらなる実施形態において、この比較行為は、トランスフォーミング増殖因子 β の非存在および存在下において同化された、少なくとも1つの細胞外マトリックス成分のレベルを比較する工程を包含する。別のさらなる実施形態において、この細胞外マトリックス成分は、コラーゲン、プロテオグリカン、無機ピロリン酸、リン酸カルシウムまたはピロリン酸カルシウム二水和物 (CPPD) である。特定のなおさらなる実施形態において、このコラーゲンは、I型コラーゲン、II型コラーゲン、X型コラーゲンまたはXI型コラーゲンである。他の実施形態において、この生物学的サンプルは、サイブリッド細胞である。

【0045】

いくつかの実施形態において、この比較工程は、解糖を減少させることなく、少なくとも1つの電子伝達系酵素の活性を減少させるに十分な条件および時間で、ミトコンドリア機能の少なくとも1つのインヒビターの非存在および存在下で、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較する工程を包含する。さらなる実施形態において、このミトコンドリア機能のインヒビターは、アンチマイシン、オリゴマイシン、ロテノンまたはシアン化物である。他の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、ミトコンドリア電子伝達系酵素であり、そして特定のさらなる実施形態において、この比較工程は、電子伝達系酵素の触媒活性を測定する工程を包含する。特定のなおさらなる実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりの酵素活性を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりの酵素活性を決定する工程を包含し、そして別の実施形態において、この比較工程は、電子伝達系酵素量を測定する工程を包含する。さらなる実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりの酵素量を決定する工程を包含し、そして別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりの酵素量を決定する工程を包含する。いくつかの実施形態において、このミトコンドリア電子伝達系酵素は、ミトコンドリア複合体Iの少なくとも1つのサブユニットを含み；他の実施形態において、このミトコンドリア電子伝達系酵素は、ミトコンドリア複合体IIの少なくとも1つのサブユニットを含み；他の実施形態において、このミトコンドリア電子伝達系酵素は、ミトコンドリア複合体IIIの少なくとも1つのサブユニットを含み；他の実施形態において、このミトコンドリア電子伝達系酵素は、ミトコンドリア複合体IVの少なくとも1つのサブユニットを含み；特定のさらなる実施形態において、このミトコンドリア複合体IVの少なくとも1つのサブユニットは、COX1、COX2またはCOX4であり；そして他の実施形態において、このミトコンドリア電子伝達系酵素は、ミトコンドリア複合体Vの少なくとも1つのサブユニットを含む。さらなる実施形態において、このミトコンドリア複合体Vの少なくとも1つのサブユニット

は、A T Pシンターゼサブユニット8またはA T Pシンターゼサブユニット6である。

【0046】

いくつかの実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、サンプルにおける1細胞当たりのA T P量であり、そして特定のさらなる実施形態において、この比較工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりのA T P量を測定する工程を包含する。特定の他のさらなる実施形態において、この比較工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりのA T P量を測定する工程を包含し、そして特定の他の実施形態において、この比較工程は、サンプルにおける1単位量のミトコンドリア質量当たりのA T P量を測定する工程を包含し；なお他の実施形態において、この比較工程は、サンプルにおける1単位のミトコンドリアタンパク質当たりのA T P量を測定する工程を包含する。いくつかの実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、サンプルにおけるA T P合成の速度である。他の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、A T P生合成因子である。別の実施形態において、この比較工程は、A T P生合成因子の触媒活性を測定する工程を包含し、そしてさらなる実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりのA T P生合成因子活性を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1単位量のミトコンドリア質量当たりのA T P生合成因子活性を決定する工程を包含し、そして別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりのA T P生合成因子活性を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この比較工程は、A T P生合成因子量を測定する工程を包含し、そしてさらなる実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりのA T P生合成因子量を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりのA T P生合成因子量を決定する工程を包含する。

【0047】

本発明の特定の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標

は、ミトコンドリアマトリックス成分であり、そして特定の他の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、ミトコンドリア膜成分である。いくつかのさらなる実施形態において、このミトコンドリア膜成分は、ミトコンドリア内膜成分であり、そして特定のなおさらなる実施形態において、このミトコンドリア膜成分は、アデニンヌクレオチドトランスロケーター (ANT)、電位依存性陰イオンチャネル (VDAC)、リンゴ酸 - アスパラギン酸シャトル、カルシウムユニporter、UCP - 1、UCP - 2、UCP - 3、ヘキソキナーゼ、末梢ベンゾジアゼピンレセプター、ミトコンドリア膜間 (intermembrane) クレアチンキナーゼ、シクロフィリンD、Bcl - 2 遺伝子ファミリーコードポリペプチド、トリカルボキシレートキャリアまたはジカルボキシレートキャリアである。

【0048】

特定の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、クレブス回路酵素であり、そして特定のさらなる実施形態において、この比較工程は、クレブス回路酵素の触媒活性を測定する工程を包含する。特定の他の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりの酵素活性を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりの酵素活性を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この比較工程は、クレブス回路酵素量を測定する工程を包含する。別の実施形態において、この測定工程は、サンプルにおける1ミトコンドリア当たりの酵素量を決定する工程を包含する。他の実施形態において、この比較工程は、サンプルにおける1単位のタンパク質当たりの酵素量を決定する工程を包含する。他の実施形態において、このクレブス回路酵素は、シトレートシンターゼであり、一方、他の実施形態において、このクレブス回路酵素は、アコニターゼ、イソシトレートデヒドロゲナーゼ、 α ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ、スクシニル補酵素Aシンターゼ、スクシネートデヒドロゲナーゼ、フマラーゼまたはマレートデヒドロゲナーゼである。

【0049】

いくつかの実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、

サンプルにおける1細胞当たりのミトコンドリア質量であり、これは、特定のさらなる実施形態において、ミトコンドリア選択的因子を使用して決定され、特定の他の実施形態においては、ノニルアクリジンオレンジを使用して決定される。他の実施形態において、ミトコンドリア質量は、形態計測分析によって決定される。別の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、サンプルにおける1細胞当たりのミトコンドリア数であり、そして特定のさらなる実施形態において、この比較工程は、ミトコンドリア選択的試薬を測定する工程を包含する。なおさらなる実施形態において、このミトコンドリア選択的試薬は、蛍光である。本発明の特定の実施形態において、この変更されたミトコンドリア機能の指標は、変更されたミトコンドリア機能の同時予測指標 (c o - p r e d i c t o r) であり、サンプルにおいて1細胞当たりのミトコンドリアDNA量を含み、そしてこの比較工程は、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つのさらなる指標を比較する工程をさらに包含する。別の実施形態において、この比較工程は、ミトコンドリアDNAを含む生物学的サンプルを、ミトコンドリアDNAとのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にするに十分な条件および時間で、ミトコンドリアDNAに存在する配列に相補的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと接触させることによって、ミトコンドリアDNAを測定する工程；ならびにミトコンドリアDNAへのプライマーのハイブリダイゼーションを検出し、そしてこれからミトコンドリアDNAを定量する工程を包含する。特定のさらなる実施形態において、この検出工程は、ポリメラーゼ連鎖反応、オリゴヌクレオチドプライマー伸長アッセイ、リガーゼ連鎖反応または制限断片長多型分析を含む。

【0050】

特定の実施形態においては、比較工程は、増幅されたミトコンドリアDNAを含有しているサンプルを、増幅されたミトコンドリアDNA中に存在する配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有しているオリゴヌクレオチドプライマーと、ミトコンドリアDNAに対するプライマーのハイブリダイゼーションを可能にするための条件下でそして十分な時間の間、接触させることによってミトコンドリアDNAを測定すること；およびミトコンドリアDNAに対するプライマ

一のハイブリダイゼーションを検出すること、そしてそれからミトコンドリアDNAを定量することを含む。別の実施形態においては、検出工程は、ポリメラーゼ連鎖反応、オリゴヌクレオチドプライマー伸張アッセイ、リガーゼ連鎖反応、または制限フラグメントの長さの多型性分析を含む。別の実施形態においては、ミトコンドリアDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応、転写増幅系、または自己維持の配列複製を使用して増幅される。別の実施形態においては、比較工程は、ミトコンドリアDNAを含有している生物学的サンプルを、ミトコンドリアDNA中に存在する配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有しているオリゴヌクレオチドプライマーと、ミトコンドリアDNAに対するプライマーのハイブリダイゼーションを可能にするための条件下でそして十分な時間の間、接触させることによってミトコンドリアDNAを測定すること；ならびに生成物を生じるミトコンドリアDNAに対するプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸張を検出すること、そしてそれからミトコンドリアDNAを定量することを含む。

【0051】

別の実施形態においては、比較工程は、増幅されたミトコンドリアDNAを含有しているサンプルを、増幅されたミトコンドリアDNA中に存在する配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有しているオリゴヌクレオチドプライマーと、ミトコンドリアDNAに対するプライマーのハイブリダイゼーションを可能にするための条件下でそして十分な時間の間、接触させることによってミトコンドリアDNAを測定すること；ならびに生成物を生じるミトコンドリアDNAに対するプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸張を検出すること、そしてそれからミトコンドリアDNAを定量することを含む。さらなる実施形態においては、ミトコンドリアDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応、転写増幅系、または自己維持配列の複製を使用して増幅される。別の実施形態においては、サンプル中のミトコンドリアDNAの量は、オリゴヌクレオチドプライマー伸張アッセイを使用して決定される。

【0052】

本発明の特定の他の実施形態に着目すると、変更されたミトコンドリア機能の指標は、フリーラジカルの産生である。他の実施形態においては、変更されたミ

トコンドリア機能の指標は、反応性の酸素種、タンパク質のニトロシル化、タンパク質のカルボニル修飾、DNAの酸化、mtDNA酸化、タンパク質の酸化、タンパク質のカルボニル修飾、タンパク質のマロンジアルデヒド付加物、グリコキシド化生成物、リポキシド化生成物、8'-OH-グアノシン付加物、またはTBARSである。他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、反応性の酸素種であり、そして他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、タンパク質のニトロシル化であり、一方、なお他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、DNAの酸化である。特定の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標はミトコンドリアDNAの酸化である。特定の他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、タンパク質のカルボニル修飾である。他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答であり、そしてなお他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、少なくとも1つのアポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答である。

【0053】

別の局面においては、本発明は、関節炎の障害を有しているヒトの患者を処置する方法を提供する。この方法は、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標を正常なレベルにまで実質的に回復させる試薬を患者に投与する工程を包含する。特定のさらなる実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、ミトコンドリア電子輸送鎖酵素であるKrebs回路酵素、ミトコンドリアマトリックス成分、ミトコンドリア膜成分、またはATPの生合成因子である。なおさらなる実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、1つの細胞あたりのミトコンドリアの数または1つの細胞あたりのミトコンドリアの質量である。他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、ATPの生合成因子である。別の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、1つのミトコンドリアあたりのATPの量、単位ミトコンドリア質量あたりのATPの量、単位タンパク質あたりのATPの量、または単位ミトコンドリアタンパク質あたりのATPの量である。いくつかの実

施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、フリーラジカルの産生を含み、そしていくつかの実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、上昇した細胞内カルシウムに対する細胞の応答性を含む。他の実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標は、変更されたミトコンドリア機能の共働指標であり、これは、特定のさらなる実施形態においては、患者中の1つの細胞あたりのミトコンドリアDNAの量である。

【0054】

本発明の別の局面は、関節炎の障害を処置する方法を提供することである。この方法は、ミトコンドリア機能を変更する薬剤の有効量を投与する工程を包含する。特定の実施形態においては、薬剤は、ミトコンドリア防御剤であり、そして特定の他の実施形態においては、薬剤は抗酸化剤である。

【0055】

本発明はまた、別の局面において、脊椎動物被験体に由来する生物学的サンプル中の関節炎の障害についての危険性を同定するため、関節炎の疾患の進行の程度を決定するため、または障害のサブタイプに従って脊椎動物種の被験体を階層分類するためのキットを提供する。このキットは、請求項1、2、6、または7のいずれか1項に記載されている方法に従って変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを検出し得る少なくとも1つの試薬、ならびに指標の検出における使用に適切な補助的な試薬を含有する。

【0056】

本発明のなお別の局面は、合成の軟骨のパッチを調製する方法を提供することである。これは、サイブリットの軟骨細胞を作製するために、関節炎の障害を有している第1の被験体に由来する軟骨細胞中に異種のミトコンドリアDNAを導入すること（ここでは、外因性のミトコンドリアDNAは、関節炎の障害を有さないことが既知の第2の被験体に由来する）；ならびに軟骨細胞が細胞外マトリックスを精巧に作り上げることを可能にする条件下で、そして十分な時間の間、サイブリッドの軟骨細胞を培養することを含む。

【0057】

なお別の局面においては、本発明は、合成の軟骨のパッチを調製するための方法を提供する。この方法は、少なくとも1つのミトコンドリア防御剤の存在下で関節炎の障害を有している被験体に由来する軟骨細胞を、軟骨細胞が細胞外マトリックスを精巧に作り上げることを可能にする条件下で、そして十分な時間の間、培養する工程を包含する。特定の実施形態においては、軟骨細胞は、抗酸化剤である少なくとも1つのミトコンドリア防御剤の存在下で培養される。

【0058】

別の局面においては、本発明は、合成の軟骨のパッチを調製する方法を提供する。この方法は、関節炎の障害を有している被験体に由来する軟骨細胞の選択されていない集団から、増強させられたミトコンドリア機能を有している軟骨細胞のサブ集団を選択する工程；および軟骨細胞が細胞外マトリックスを精巧に作り上げることを可能にする条件下で、そして十分な時間の間、軟骨細胞のサブ集団を培養する工程を包含する。特定の実施形態においては、本発明は、本明細書中に記載される方法の任意の1つによって産生される合成の軟骨のパッチを提供する。特定の他の実施形態においては、本発明は、被験体中の予め決定された部位の軟骨の欠損を修復する方法を提供する。この方法は、予め決定された部位に本明細書中に記載される合成の軟骨のパッチを外科的に移植する工程を包含する。特定の実施形態においては、本発明はさらに、被験体に対して1つ以上のミトコンドリア防御剤を投与する工程を包含する。特定の他の実施形態においては、1つ以上のミトコンドリア防御剤は、少なくとも1つの抗酸化剤を含む。

【0059】

本発明のこれらおよび他の局面が、以下の詳細な説明および添付の図面を参照して明らかとなる。さらに、種々の参考文献が本明細書中に示され、これらは、本発明の特定の局面をより詳細に記載し、そして従って、それらの全体が参考として援用されている。

【0060】

(発明の詳細な説明)

本発明は、関節炎の障害の症状の検出の前および症状の検出の後において有用であり、そして関節炎の障害を処置するための治療薬の同定において有用である

、組成物および方法を提供する。

【0061】

本発明は、一部、脊椎動物の関節の軟骨細胞中でのミトコンドリアの酸化的リン酸化の予想外の観察に由来する。これは、好気性の呼吸による関節の軟骨細胞中でのATPの産生を含む - すなわち、ATPは、関節の軟骨細胞中でのミトコンドリアの酸化的リン酸化によって生じ、そしてこれらの細胞中での嫌気性の解糖に由来するものではない。本発明はまた、一部、このようなミトコンドリアの呼吸活性の変更（例えば、増大または減少）、および特に、ミトコンドリアによって生成されるATPの変更が、関節炎の障害の病因において重要な役割を果たすことの驚くべき発見にも一部関連する。上記に記載されるように、関節の軟骨細胞が置かれている関節の軟骨の環境の無血管性の性質の観点から、これらの細胞は、生合成のために嫌気性の呼吸を使用することによって適合させられるようであり、そしてこれまで、関節炎の障害における関節の軟骨細胞のミトコンドリアの役割は、大きく無視されている。本明細書中で開示されるように、変更されたミトコンドリア機能の指標は、関節炎の障害を有する危険性、または被験体中での疾患の進行の程度を同定するための診断アッセイにおいて有用である。また、本明細書中で議論されているように、変更されたミトコンドリア機能の指標は、関節炎の障害を処置するために適切な薬剤についてのスクリーニングアッセイにおいて、関節炎の患者の集団を階層分類するために、そして治療処置の効力をモニタリングするために、有用である。本発明はまた、本明細書中で開示されるような、関節炎の障害を処置するために有用であり得るミトコンドリア防御剤にも関する。

【0062】

本発明の方法は、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標の、増大したかまたは減少したレベルとの、関節炎の障害の相関関係に、一部関連する。詳細には、本発明に従って、「変更されたミトコンドリア機能の指標」は、症状、プロセス、経路、動的な構造、状態、または他のミトコンドリアに関連している活性に直接関連している、任意の検出可能なパラメーターであり得る。そしてこれは、被験体または生物学的な供給源に由来する生物学的サンプル中の変

更されたミトコンドリア機能の検出を可能にする。従って、本発明の方法は、変更されたミトコンドリア機能の指標が、例えば、ミトコンドリア酵素、または他の本明細書中で提供されるような基準であり得るような相関関係に一部関係する。

【0063】

「変更されたミトコンドリア機能」は、任意の症状または状態をいい得、ミトコンドリア機能に直接または間接的に関係している任意の構造または活性が、コントロールまたは標準と比較して統計学的に有意な様式で変更されている、関節炎の障害を伴う症状または状態を含む。変更されたミトコンドリア機能は、ミトコンドリア外の構造または事象、ならびにミトコンドリアの構造または事象、あるいはミトコンドリア遺伝子とミトコンドリア外遺伝子および/またはそれらの遺伝子産物との間での直接の相互作用、あるいはこのような相互作用の結果として形成され得る中間体間での相互作用の結果として生じる構造的または機能的な変化（代謝物質、異化代謝産物、基質、前駆体、補因子などを含む）にその起点を有し得る。

【0064】

さらに、変更されたミトコンドリア機能は、生物学的な供給源のいくつかまたは全ての細胞における、変更された呼吸、代謝活性または他の生化学的な活性または生物物理学的な活性を含み得る。限定的ではない例として、明らかに損傷したETC活性は、増大したROSの生成または欠損した酸化的リン酸化であり得るので、この明らかに損傷したETC活性は、変更されたミトコンドリア機能に関連し得る。さらなる例として、変更されたミトコンドリア膜電位、アポトーシス経路の誘導、ならびに細胞中の異形性の化学的および生化学的に架橋された種の形成（酵素的な機構によるかまたは非酵素的な機構によるかにはかわらず）が、全て、変更されたミトコンドリア機能の指標として認識され得る。これらのおよび他の限定的ではない変更されたミトコンドリア機能の例が、以下にさらに詳細に記載される。

【0065】

いかなる理論にも束縛されることも望まないが、関節炎の障害の変更されたミ

トコンドリア機能の特徴はまた、フリーラジカル酸化以外の機構による（例えば、ミトコンドリアを通過する膜のシャトルおよびトランスポーター（例えば、アデニンヌクレオチドトランスポーターまたはリンゴ酸 - アスパラギン酸（malate - aspartate）シャトル）における欠損によるか、細胞内のカルシウムの流れによるか、ATPの生合成における欠損によるか、ヘキソキナーゼもしくは他の酵素のポリリンとの欠損した会合によるか、または他の事象による）ミトコンドリア膜の電気化学的な電位の損失にも、関連し得る。このようなミトコンドリア内膜の電位の崩壊は、ミトコンドリア遺伝子、遺伝子産物、または関連する下流の媒介因子分子および／あるいはミトコンドリア外遺伝子、遺伝子産物、または関連する下流の媒介因子の直接的または間接的な影響によって生じ得るか、あるいは他の公知の原因または未知の原因によって生じ得る。

【0066】

本発明の特定の実施形態においては、関節炎の障害が、少なくとも1つの「変更されたミトコンドリア機能の共働指標（co-indicator）」の増大されたレベルまたは減少されたレベルと相関させられ得る。変更されたミトコンドリア機能の共働指標は、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つのさらなる、そして異なる酵素または非酵素指標を伴って同時に決定される、本明細書中に提供されるような変更されたミトコンドリア機能の指標をいう。例えば、変更されたミトコンドリア機能の共働指標は、本明細書中に提供される変更されたミトコンドリア機能の指標を意味し得、これは、変更されたミトコンドリア機能のさらなる非酵素指標と相関して定量される。例えば、変更されたミトコンドリア機能の共働指標は、サンプル中の単位ミトコンドリアタンパク質あたりのそのレベルに基づいて決定される酵素であり得る（例えば、サンプル中のミトコンドリアタンパク質は、変更されたミトコンドリア機能のさらなる非酵素指標であり得る）が、本発明は、そのように限定される必要はない。

【0067】

背景を通じて、機能的なミトコンドリアは、ミトコンドリアDNA（mtDNA）中に配置されるミトコンドリア遺伝子によって、そして環状のミトコンドリアゲノム中には配置されないミトコンドリア外遺伝子（例えば、核遺伝子）によ

ってコードされる遺伝子産物を含む。16.5 kbのmtDNAは、22個のtRNA、2個のリボソームRNA (rRNA)、および電子輸送鎖 (ETC) の13個の酵素をコードし、例えば、呼吸による酸化的リン酸化が起こる場合に、多複合体ミトコンドリアアセンブリを精巧に作り上げる。ミトコンドリアの構造タンパク質および機能タンパク質の集団の大部分は、ミトコンドリア外遺伝子、そしてほとんどの場合には、おそらく核遺伝子によってコードされる。従って、ミトコンドリア遺伝子およびミトコンドリア外遺伝子は、直接、または遺伝子産物およびそれらの下流の中間体 (代謝物質、異化代謝産物、基質、前駆体、補因子などを含む) を通じて間接的に、相互作用し得る。ミトコンドリア機能における変更 (例えば、損傷した電子輸送活性、欠損した酸化的リン酸化、または増大したフリーラジカルの産生) は、従って、欠損したmRNA、欠損したミトコンドリア外DNA、欠損したミトコンドリア遺伝子産物またはミトコンドリア外遺伝子産物、欠損した下流の中間体、あるいはこれらのおよび他の因子の組合せの結果として生じ得る。

【0068】

本発明の最も高度に好ましい実施形態においては、酵素は、本明細書中で提供されるような変更されたミトコンドリア機能の指標である。酵素は、ミトコンドリア酵素であり得る。これは、さらに、ETC酵素またはKrebs回路の酵素であり得る。酵素はまた、ATPの生合成因子 (これは、ETC酵素および/またはKrebs回路の酵素を含み得る) であり得るか、または本明細書中に提供されるようなATPの産生に関連する他の酵素もしくは細胞性の成分であり得る。「非酵素」は、酵素ではない (すなわち、本明細書中に提供されるようなミトコンドリア酵素でもATPの生合成因子でもない) 変更されたミトコンドリア機能の指標をいう。

【0069】

他の高度に好ましい実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、以下に記載されるような、任意のATPの生合成因子である。他の好ましい実施形態においては、指標は、ATP産生である。他の好ましい実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、ミトコンドリアの質量または

ミトコンドリアの数であり得る。本発明に従うと、ミトコンドリアDNA含有量はまた、変更されたミトコンドリア機能の指標でもあり得る。他の好ましい実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、フリーラジカルの産生、上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答、アポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答であり得る。

【0070】

(酵素である変更されたミトコンドリア機能の指標)

本発明の特定の局面は、脊椎動物中の関節炎の障害についての危険性を同定するための方法に関連する。この方法は、生物学的サンプル中の変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを、コントロールサンプルと比較する工程を包含する。ここでは、変更されたミトコンドリア機能の指標は酵素である。本明細書中で提供される場合は、特定の最も高度に好ましい実施形態においては、このような酵素は、ミトコンドリア酵素または酵素であるATPの生合成因子(例えば、ETC酵素またはKrebsサイクルの酵素)であり得る。

【0071】

「酵素の量」、「酵素の触媒活性」、または「酵素の発現レベル」という本明細書中での言及は、ミトコンドリア酵素の量、活性、または発現のレベル、あるいはATPの生合成因子の量、活性、または発現のレベルの任意のものについての言及を含むことを意味する；これらのいずれかはさらに、例えば、ETC酵素の量、活性、または発現のレベル、あるいはKrebs回路の酵素の量、活性、または発現のレベルを含み得る。本発明の最も好ましい実施形態においては、酵素は、本明細書中で提供されるような酵素触媒活性を有する、天然または組換えのタンパク質またはポリペプチドである。このような酵素は、限定的ではない例によって、酵素、ハロ酵素、酵素複合体、酵素サブユニット、酵素フラグメント、誘導體、またはアナログなどであり得、これらには、短縮型の酵素、プロセッシングされた酵素、または切断された酵素が含まれる。

【0072】

本明細書中で提供されるような変更されたミトコンドリア機能の指標であり得る「ミトコンドリア酵素」は、酵素触媒活性、および/または酵素の触媒活性に

影響を与え得る酵素補因子としての機能を有する、ミトコンドリア分子成分をいう。本明細書中で使用される場合は、ミトコンドリアは、「ミトコンドリア分子成分」から構成される。これは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、またはそれらの誘導体；脂質、脂肪酸など、またはそれらの誘導体；炭水化物、サッカライドなど、またはそれらの誘導体、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジン、もしくは関連する分子、またはそれらの誘導体など；あるいは、これらの成分の任意の共有的に複合体化されたかまたは非共有的に複合体化された組合せ、あるいは、安定であるかまたはミトコンドリアの一時的な構成成分である任意の他の生物学的分子であり得る。

【0073】

本明細書中で提供されるような変更されたミトコンドリア機能の指標であり得るかまたは変更されたミトコンドリア機能の共働指標であり得るミトコンドリア酵素、あるいは、本明細書中で提供されるような変更されたミトコンドリア機能の指標であり得るATPの生合成因子は、ETC酵素を含み得る。これは、ミトコンドリア内膜およびミトコンドリアマトリックスと関係しているミトコンドリア電子輸送鎖(ETC)複合体のミトコンドリア酵素成分である、任意のミトコンドリア分子成分である。ETC酵素は、ミトコンドリア遺伝子および核遺伝子によってコードされる複数のETCサブユニットポリペプチドの任意のものを含み得る。ETCは代表的には、複合体I(NADH:ユビキノンレダクターゼ)、複合体II(スクシネートデヒドロゲナーゼ)、複合体III(ユビキノン:チトクロームcオキシドレダクターゼ)、複合体IV(チトクロームcオキシダーゼ)、および複合体V(ミトコンドリアATP合成酵素)を含むと記載される。ここでは、それぞれの複合体は、複数のポリペプチドおよび補因子を含む(概説については、例えば、Walkerら、1995、Meths. Enzymol. 260:14; Ernsterら、1981 J. Cell Biol. 91:227s-255s、およびその中で引用される参考文献を参照のこと)。

【0074】

本発明の特定の好ましい実施形態においては、当該分野で公知である本明細書中に提供されるミトコンドリア機能のインヒビター(例えば、ミトコンドリア酵

素インヒビター)を使用して、1つ以上のこのような酵素(例えば、ミトコンドリア酵素)の活性を阻害することが、本明細書中に提供されるような酵素である変更されたミトコンドリア機能の指標のレベルを決定する目的のために、有用であり得る。特定の特に好ましい実施形態においては、ミトコンドリア機能のインヒビターは、少なくとも1つのミトコンドリア機能を検出可能に損傷するが、解糖を検出可能には減少させない条件を使用して、使用される。例えば、このような条件下では、好気性の呼吸(例えば、酸化的リン酸化)は損傷されるが、一方、嫌気性の呼吸は続く。当業者は、当該分野で周知である方法論に従い、そして本発明の開示に基づいて、このようなインヒビターの使用のための適切な用量、条件、およびサンプル(例えば、単離されたミトコンドリア、全細胞または浸透性にされた細胞)を決定することが可能である。

【0075】

ミトコンドリア機能のインヒビターとして、以下が挙げられるがこれらに限定されない: ETCインヒビター(複合体Iのインヒビター(例えば、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)、1-メチル-4-フェニルピリジニウム(MPP⁺)、アモバルビタール、ロテノイド(例えば、ロテノンおよびデグエリン))を含む); ピエリシジン(piericidin(例えば、ピエリシジンA、ピエリシジンB、ヒドロキシピリジン、およびユビシジン-3); annonaceousアセトゲニン(例えば、Rolliniastatin-1および-2); バニロイド(例えば、カプサイシン); フェノキサン; アノニン(annonin)VI; (概説については、例えば、Espositoら、Biochim. Biophys. Acta 1364: 222-235、1998を参照のこと); 複合体IIのインヒビター(例えば、テノイルトリフルオロアセトン(TTFA)、マロン酸塩、および3-ニトロプロピオン酸); 複合体IIIのインヒビター(例えば、アンチマイシンA、スチグマテリンA、ウンデシルヒドロキシドキシベンゾチアゾール(UHDBT)、ヘプタデシルメルカプトヒドロキシキノリンキノン(HMHQQ)、フニコロシン、およびミキソチアゾール); 複合体IVのインヒビター(例えば、アジ化ナトリウム、一酸化窒素、シアン化合物、および一酸化炭素); 乳酸デヒ

ドロゲナーゼのインヒビター（例えば、オキサム酸）；ミトコンドリアカルシウムユニポーター（uniporter）のインヒビター（例えば、ルテニウムレッドおよびRu360、Matlibら、J. Biol. Chem. 273: 10223 - 10231、1998）、および細胞内カルシウムイオン（Ca²⁺）レベルを増大させる薬剤（例えば、イオノマイシン、1 - (4, 5 - ジメトキシ - 2 - ニトロフェニル) エチルエステル（カルシマイシンまたはA23187としてもまた公知である）、4 - ブロモA - 23187、およびEth129のようなイオノフォア）、およびカルシウムの細胞内ミトコンドリア外の貯蔵の放出を刺激する薬剤（例えば、タブシガルギンおよびオカダ酸）；酸化的リン酸化のインヒビター（例えば、オリゴマイシン、塩化トリブチルスズ、オーロベルチン、ルタマイシン、ベンツリジシン、水銀製剤、ジシクロヘキシルカルボジイミド（dicyclohexylcarbodiimide）（DCCDとしてもまた公知である）、およびDio - 9）；呼吸の脱共役剤（例えば、2, 4 - ジニトロフェノール（DNP）、p - トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン（FCCP）、およびシアン化カルボニル m - クロロフェニルヒドラゾン（M - CCCPまたはCCCP））；ミトコンドリアの輸送機構のインヒビター（例えば、ミトコンドリアのアデニンヌクレオチド輸送体（ANT）タンパク質のインヒビター（例えば、アトラクチロシド、カルボキシアトラクチロシド、ボンクレキン酸））；ジカルボキシレートキャリアのインヒビター（これらは、L - マレート、スクシネート、マロネート、またはオキササセテートを無機リン酸塩に転換し、そして例えば、n - ブチルマロネートまたはフェニルスクシネートによって阻害される）；トリカルボキシレートキャリアのインヒビター（これは、クエン酸塩、イソクエン酸塩、リンゴ酸塩およびホスホエノールピルビン酸塩を輸送し、そして例えば、クエン酸n - エチルによって阻害される）；ミトコンドリアタンパク質合成のインヒビター（例えば、クロラムフェニコール）；ならびにミトコンドリアDNAの複製および/または維持のインヒビター（例えば、エチジウムブロマイド、または任意の種々の抗ウイルス薬剤（例えば、ddC、ddI、AZT、および他のものを含み、例えば、それぞれ、代理人登録番号第660088.409号および同第660088.409C1号を有している、同時係属

中の米国特許出願番号第09/069,489号および同第09/301,517号を参照のこと))。

【0076】

以下にさらに詳細に記載されそして軟骨細胞の操作に係る特定の好ましい実施形態においては、選択されていない軟骨細胞の集団が、薬剤で処理され得、そして/または増強されたミトコンドリア機能を有している細胞を含有している軟骨細胞のサブ集団についてポジティブに選択する条件に供され得るか、あるいは、選択されていない軟骨細胞の集団が、増強されたミトコンドリア機能を有している軟骨細胞のサブ集団を単離するために、比較的低いミトコンドリア機能を有する細胞に対してネガティブに選択する条件に対して暴露され得る。例えば、被験体または本明細書中に提供される生物学的な供給源(例えば、関節炎の障害を有している患者)に由来する軟骨細胞のコレクションが、致死量未満の用量のミトコンドリア機能のインヒビターを用いて、本明細書中で提供されるように処理され得る。このような細胞は、付随してまたは続いて、細胞が、生存性であるために正常から高いレベルのミトコンドリア機能を必要とする条件に対して暴露される。例えば、ピルビン酸およびウリジンを欠失している細胞培養培地が、ミトコンドリア機能において欠損している細胞(例えば、rho-zero細胞)がこれらの条件下で死亡する場合に、好気性の能力を有する細胞について選択するために使用され得る(Millerら、J. Neurochem. 67:1897-1907、1996)。別の例においては、ミトコンドリアの酸化が、嫌気性の醗酵の場合にグルコース1分子あたり18倍のはるかに多いATPを生じるので、ATPの競合インヒビター(例えば、ddATP、鎖終結ヌクレオチド)が、比較的高レベルのATPを産生する細胞(増強されたミトコンドリア機能を有している細胞の集団と高度に重複するサブ集団)について選択するために使用され得る。

【0077】

全てまたはほとんどの細胞が、ミトコンドリア機能のインヒビターの非存在下でこのような条件を生存し得るが、増強されたミトコンドリア機能を有する細胞だけが、このような機能が細胞の生存のために不可欠である場合に、このような

インヒビターの存在下で存続する。すなわち、正常なまたは標準以下のミトコンドリア機能を有している細胞は、ミトコンドリア機能の1つ以上のインヒビターでの処理の間およびその後に、なお低いミトコンドリア機能を有し、そして従って、増強されたミトコンドリア機能を指示する選択を生存しない。このような選択手順を生存する細胞は、1つ以上のミトコンドリア機能の増強されたレベルを有すると予想され、そしてこのことは、当該分野で公知であるかまたは本明細書中に記載されるミトコンドリア機能についての細胞の1つ以上のスクリーニング方法を使用して確認される。

【0078】

本明細書中に提供される変更されたミトコンドリア機能の指標であり得るミトコンドリア酵素、または本明細書中に提供される変更されたミトコンドリア機能の指標であり得るATPの生合成因子はまた、Krebs回路の酵素を含み得る。これは、ミトコンドリア分子成分を含み、これは、クエン酸回路またはトリカルボン酸回路としてもまた公知である一連の生化学的/生体エネルギー反応を媒介する(例えば、Lehninger、Biochemistry, 1975 Worth Publishers, NY: VoetおよびVoet, Biochemistry, 1990、John Wiley & Sons, NY: Mathewsおよびvan Holde, Biochemistry, 1990、Benjamin Cummings, Menlo Park, CAを参照のこと)。Krebs回路の酵素は、クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ複合体、スクシニルCoAシンターゼ、スクシネートデヒドロゲナーゼ、フマラーゼ、およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼのサブユニットおよび補因子を含む。Krebs回路の酵素はさらに、Krebs回路の反応に機能的に関係している酵素および補因子(例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、補酵素A、チアミンピロリン酸、リポアミド、グアノシンジホスフェート、フラビンアデニンジヌクレオチド、およびヌクレオシドジホスホキナーゼなど)を含む。

【0079】

本発明の方法はまた、ATPの生合成因子、変更されたATPの量、または変

更された量のATPの産生であり得る、変更されたミトコンドリア機能の指標との、関節炎の障害の相関関係に一部関係し得る。例えば、減少したミトコンドリアATPの生合成は、それによって関節炎の障害についての危険性が同定され得る変更されたミトコンドリア機能の指標であり得る。

【0080】

「ATP生合成因子」は、ミトコンドリア中でのATPの産生の効率に寄与する任意の天然に存在する細胞性の成分をいう。このような細胞性の成分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、またはそれらの誘導体；脂質、脂肪酸など、またはそれらの誘導体；炭水化物、サッカライドなど、またはそれらの誘導体、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジン、もしくは関連する分子、またはそれらの誘導体などであり得る。ATPの生合成因子として、ETCまたはKrebs回路の少なくとも1つの成分（例えば、Lehninger、Biochemistry, 1975 Worth Publishers, NY: VoetおよびVoet, Biochemistry, 1990、John Wiley & Sons, NY: Mathewsおよびvan Holde, Biochemistry, 1990、Benjamin Cummings, Menlo Park, CAを参照のこと）、およびATPの合成に関係している任意のタンパク質、酵素、または他の細胞性の成分（このようなATPの生合成因子が核遺伝子の産物であるか核外遺伝子（例えば、ミトコンドリア遺伝子）の産物であるかにはかかわらず）を含む。ATPの合成への関与には、ATP合成に関連する任意の反応の触媒、膜を通過する輸送、および/またはATPもしくは酵素補因子の運び出し、ミトコンドリア酵素をコードする遺伝子の転写および/またはこのような遺伝子の転写物の翻訳が挙げられるが、これらに限定されない。

【0081】

細胞性の成分がATPの生合成因子であるかどうかを決定するための組成物および方法は、当該分野で周知であり、そしてATPの産生を決定するための方法（サンプル中でのATPの産生の速度の決定を含む）、およびATP自体の定量のための方法を含む。ATPの産生に対するATPの生合成因子の寄与は、例え

ば、細胞または細胞を含まない系に対して添加される単離されたATPの生合成因子を使用して、決定され得る。ATPの生合成因子は、ATPの産生に影響を与える生合成経路の1つの工程または複数の工程を直接または間接的に媒介し得る。例えば、ATPの生合成因子は、ATPの産生を導く特定の化学反応を触媒する酵素であり得る。別の例として、ATPの生合成因子は、このような酵素の効率を増強する補因子であり得る。別の例として、ATPの生合成因子は、ATPの生合成経路に直接または間接的に影響を与える細胞系または細胞を含まない系中に導入される外因的な遺伝子エレメントであり得る。当業者は、候補のATPの生合成因子の存在下および非存在下でのATP生合成経路によるATPの産生を比較することが容易であり得る。ATPの産生の慣用的な決定は、定量的なATPの検出のための任意の公知の方法を使用して、例えば、例示的であるが限定的ではないが、以下によって、達成され得る：クロマトグラフィーによる単離を必要に応じて含むサンプルからの差示的抽出によって；分光測光法によって；例えば、 ^{32}P のような検出可能に標識されたATP前駆体分子の適切な形態と接触させられたサンプルから回収した標識されたATPの定量によって；ATPの合成または分解に関連する酵素活性の定量によって；あるいは当該分野で公知の他の技術によって。従って、本発明の特定の実施形態においては、生物学的サンプル中のATPの量または生物学的サンプル中でのATPの産生（ATPの産生の速度を含む）は、変更されたミトコンドリア機能の指標であり得る。例えば、1つの実施形態においては、ATPは、D-ルシフェリンのルシフェラーゼによって触媒される酸化（ATP依存性のプロセスである）の発光を測定することによって定量され得る。

【0082】

本発明の特定の好ましい実施形態においては、ATPの産生は、サンプル中の単位的全細胞性のDNAあたりの（または細胞あたりの）ATPの単位として示され得る。そして特定の他の好ましい実施形態においては、ATPの産生は、サンプル中の単位的全細胞性のDNAあたりで（または細胞あたりの）、単位時間あたりで産生されるATPの単位（例えば、速度）として示され得る。特定の他の実施形態においては、ATPの産生は、サンプル中の単位タンパク質あたりの

A T Pの単位として示され得、そして他の実施形態においては、サンプル中の単位タンパク質あたりの単位時間あたりで産生されたA T P（例えば、速度）の単位として、示され得る。特定の他の好ましい実施形態においては、A T Pの産生は、サンプル中の単位のミトコンドリアの質量あたりの単位時間あたりで生成されたA T Pの単位（例えば、速度）として示され得る。特定の他の好ましい実施形態においては、A T Pの産生は、サンプル中の単位のミトコンドリアタンパク質の質量あたりの単位時間あたりに生成されたA T Pの単位（例えば、速度）として示され得る。

【0083】

「酵素触媒活性」は、1つ以上の特定の細胞性の機能（単数または複数）に関連する特定の酵素または酵素のカテゴリーによって行われる任意の機能をいう。例えば、「A T Pの生合成因子の触媒活性」は、A T Pの産生に寄与する、本明細書中で提供されるようなA T Pの生合成因子によって行われる任意の機能をいう。代表的には、酵素の触媒活性は、特定の酵素（例えば、A T Pの生合成因子である酵素）による化学反応の促進として証明される。ここでは、少なくとも1つの酵素基質または反応物が、生成物を形成するように共有的に改変される。例えば、酵素の触媒活性は、共有的な化学結合の形成または切断によって改変される基質または反応物を生じ得るが、本発明はそのように限定される必要はない。酵素の触媒活性を測定する種々の方法が、当業者に公知であり、そして決定される特定の活性に依存する。

【0084】

本明細書中で提供されるミトコンドリア酵素またはA T Pの生合成因子である酵素を含む多くの酵素については、酵素の触媒活性についての定量基準が十分に確立されている。これらの基準として、例えば、国際単位（I U）によって、酵素の代謝回転の回数によって、触媒速度定数（ K_{cat} ）によって、ミハエリスメンテン定数（ K_m ）によって、比活性によって、または少なくとも1つの酵素の触媒活性のレベルを測定するための当該分野で公知の任意の他の酵素学的方法によって、定義され得る活性が挙げられる。ミトコンドリア酵素（例えば、A T Pの生合成因子）の比活性は、単位時間あたりに生成物に検出可能に転換される基

質の単位として、そして必要に応じて、さらに、単位サンプルの質量あたり（例えば、単位タンパク質の質量あたり、または単位ミトコンドリアの質量あたり）で、示され得る。

【0085】

本発明の特定の好ましい実施形態においては、酵素の触媒活性は、サンプル中の単位全タンパク質あたりの単位時間あたりに、酵素によって生成物に検出可能に転換される基質の単位として示され得る。特定の特に好ましい実施形態においては、酵素の触媒活性は、サンプル中の単位ミトコンドリア質量あたりの単位時間あたりに酵素によって生成物に検出可能に転換される基質の単位として示され得る。特定の高度に好ましい実施形態においては、酵素の触媒活性は、サンプル中の単位ミトコンドリアタンパク質の質量あたりの単位時間あたりに酵素によって生成物に検出可能に転換される基質の単位として示され得る。酵素の触媒活性の産物は、特定の産物の量および生理化学的特性に依存して、適切な方法によって検出され得る。従って、検出は、例えば、例示の目的でそして限定的ではなく、放射活性、比色、分光光度的に、蛍光によって、免疫的に、または質量分析による手順、または当業者に容易に明らかである他の適切な手段により得る。

【0086】

本発明の特定の実施形態においては、酵素の触媒活性の生成物の検出は、直接達成され得、そして特定の他の実施形態においては、生成物の検出は、マーカー酵素、色素、放射性核種、発光基、蛍光基、またはビオチンなどのような、基質または反応物中への検出可能なレポーター部分または標識の導入によって達成され得る。未反応の基質および/または反応生成物として存在し、続いて酵素の触媒活性をアッセイするために反応させられるこのような標識の量が、次いで、特異的な検出可能なレポーター部分または標識について適切な方法を使用して決定される。放射活性基、放射性核種の崩壊のモニタリング、シンチレーションカウンティング、シンチレーション接近アッセイ（SPA）、またはオートラジオグラフ方法が、一般的に適切である。免疫学的な測定について、適切に標識された抗体が、調製され得る。これらとして、例えば、放射性核種で、蛍光団で、アフィニティータグで、ビオチンまたはビオチン模擬配列で標識されたもの、あるい

は抗体 - 酵素結合体として調製されたものが挙げられる (例えば、Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology、1986、Blackwell Scientific、Boston; Scouten, W. H., Methods in Enzymology 135:30-65、1987; HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory、1988; Haugland、1996 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals - 第6版、Molecular Probes, Eugene, OR; Scopes; R. K., Protein Purification: Principles and Practice, 1987、Springer-Verlag, NY; Hermanson, G. T.ら、Immobilized Affinity Ligand Techniques, 1992、Academic Press, Inc., NY; Luoら、1998 J. Biotechnol. 65:225およびその中で引用されている参考文献を参照のこと)。顕微鏡的な方法が、色素 (例えば、酵素反応の比色産物を含む)、発光基および蛍光基を検出するために使用され得る。ビオチンは、種々のレポーター基に対して結合させられたアビジンまたはストレプトアビジン (一般的には、放射活性基もしくは蛍光基、または酵素) を使用して検出され得る。酵素のレポーター基は、一般的には、基質の添加 (一般的には、特定の時間)、続いて、顕微鏡、分光光度計によって、または反応産物の他の分析によって、検出され得る。標準および標準的な添加物が、周知の技術を使用して、サンプル中の酵素の触媒活性のレベルを決定するために使用され得る。

【0087】

上記に記載されるように、ATPの生合成の因子の酵素の触媒活性はさらに、基質または反応物の共有的な変更に関与する産生を超えて、ATPの産生を導く他の機能的な活性を含み得る。例えば、例示であって、そして限定的ではないが、酵素であるATPの生合成因子は、その酵素の触媒活性を通じて細胞性の成分の間での代謝物質の移動を促進する、膜貫通輸送分子をいい得る。このような代

謝物質は、A T PまたはA T Pの合成に関係している他の細胞性の成分（例えば、遺伝子産物およびそれらの崩壊の中間体（代謝物質、異化代謝産物、基質、前駆体、補因子などを含む））であり得る。別の限定的ではない例として、酵素であり得るA T Pの生合成因子は、その酵素の触媒活性を通じて、一時的にA T Pの合成を促進する様式でA T Pの合成に関係している細胞性の成分に結合し得る。このような結合事象は、例えば、A T Pの合成に関係している別の酵素に対して細胞性の成分を送達し得、そして/またはA T Pの合成を促進する様式で細胞性の成分の立体構造を変更し得る。この例についてさらに、このような立体構造の変更は、シグナル導入経路、アロステリック活性化経路、転写活性化経路などの一部であり得、ここでは、細胞性の成分の間での相互作用がA T Pの産生を導く。

【0088】

このように、本発明に従って、A T Pの生合成因子として、例えば、ミトコンドリア膜タンパク質が挙げられ得る。適切なミトコンドリア膜タンパク質として、アデニンヌクレオチドトランスポーター（A N T；例えば、F i o r e ら、1998 Biochimie 80:137; K l i n g e n b e r g 1985 Ann. N. Y. Acad. Sci. 456:279）、電圧依存性の陰イオンチャンネル（V D A C、ポリンともまた呼ばれる；例えば、M a n e l l a、1997 J. Bioenergetics Biomembr. 29:525）、リンゴ酸アスパラギンシャトル）、ミトコンドリアカルシウムユニポーター（例えば、L i t s k y ら、1997、Biochem. 36:7071）、非結合タンパク質（U C P - 1、- 2、- 3；例えば、J e z e k ら、1998 Int. J. Biochem. Cell Biol. 30:1163を参照のこと）、ヘキソキナーゼ、末梢ベンゾジアゼピンレセプター、ミトコンドリア内膜クレアチンキナーゼ、シクロフィリンD、B c l - 2 遺伝子ファミリーによってコードされるポリペプチド、トリカルボキシレートキャリア（例えば、I o c o b a z z i ら、1996 Biochim. Biophys. Acta 1284:9; B i s a c c i a ら、1990、Biochim. Biophys. Acta 1019:250）、およびジカルボキシレートキャリア（例えば、

Fiermonteら、1998 J. Biol. Chem. 273:24754; Indiveriら、1993 Biochim. Biophys. Acta 1143:310; ミトコンドリア膜トランスポーターの一般的な概説については、例えば、Zonattiら、1994、J. Bioenergetics Biomembr. 26:543およびその中で引用されている参考文献を参照のこと)のようなミトコンドリア成分が挙げられる。

【0089】

「酵素量」は、本明細書中で使用される場合は、本明細書中に提供されるようなミトコンドリア酵素またはATPの生合成因子である酵素もしくは存在する(すなわち、変更されたミトコンドリア機能(酵素の触媒活性とは無関係)の指標として選択される酵素またはATPの生合成因子の物理的な存在である)別のATP生合成因子である酵素を含む酵素の量をいう。特定の酵素またはATPの生合成因子の物理化学的特性に依存して、酵素量を決定するための好ましい方法は、変化する。本発明の最も高度に好ましい実施形態においては、酵素量の決定は、タンパク質化学において慣用的な方法を使用するタンパク質またはポリペプチドのレベルの定量的な決定を含む。これらは、当業者に容易に明らかであり、例えば、以下に詳細に記載されるものであるが、これらは例示のためであって、これらに限定されない。

【0090】

従って、酵素量の決定は、本明細書中で提供されるような酵素またはATPの生合成因子である、特定の細胞性の成分(そして、好ましい実施形態においては、これは、タンパク質またはポリペプチドである)を定量するための、当該分野で公知の任意の適切な方法により得る。酵素またはATPの生合成因子の性質および物理化学的特性に依存して、酵素の量の決定は、密度計、質量分析、分光光度計、蛍光、免疫、クロマトグラフィー、電気化学的、または特定の細胞性の成分を定量的に検出するための任意の他の手段により得る。酵素量を決定する方法としてまた、上記に記載される方法が挙げられ、これらは、酵素量を直接測定する方法、および検出可能な標識またはレポーター部分を測定する方法を含み、酵素の触媒活性の産物を検出するために有用である。本発明の特定の好まし

い実施形態においては、酵素量は、単離された酵素またはATPの生合成因子の免疫による測定によって決定される。本発明の特定の好ましい実施形態においては、酵素またはATPの生合成因子のような生体分子の定量的な決定のためのこれらおよび他の免疫学的および免疫化学的技術は、以下を含むがこれらに限定されない、当業者に公知の種々のアッセイ形式を使用して使用され得る：酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫蛍光分析、免疫沈降、エチジウム透析、免疫分散、および他の技術。(例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory、1988; Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology、1986、Blackwell Scientific、Bostonを参照のこと)。例えば、アッセイは、ウェスタンブロット形式で行われ得る。ここでは、生物学的サンプルに由来するタンパク質を含有している調製物が、ゲル電気泳動に供され、適切なメンブレンに転移させられ、そして酵素またはタンパク質もしくはポリペプチドであるATPの生合成因子に特異的な抗体と反応させられる。メンブレン上での抗体の存在は、次いで、当該分野で周知でありそして上記に記載されるような、適切な検出試薬を使用して検出され得る。

【0091】

本発明の特定の実施形態においては、例えば、本明細書中で提供される酵素を含む、変更されたミトコンドリア機能の指標は、単離された形態で存在し得る。用語「単離された」は、材料が、そのもともとの環境(例えば、それが天然に存在する場合には、天然の環境)から取り出されることを意味する。例えば、生存にしている動物中に存在している天然に存在するポリペプチドは、単離されないが、天然系に同時に存在している材料のいくつかまたは全てから分離された同じポリペプチドは単離される。このようなポリペプチドは、組成物の一部であり得、そしてなお、このような組成物がその天然の環境の一部ではないように、単離される。

【0092】

アフィニティ技術が、本発明の方法に従う使用についての、酵素またはA T Pの生合成因子タンパク質もしくはポリペプチドを単離する状況において特に有用である。そして、これは、分離を達成するために、酵素またはA T Pの生合成因子を含む特異的な結合相互作用を利用する任意の方法を含み得る。例えば、酵素またはA T Pの生合成因子タンパク質もしくはポリペプチドは、共有的に付着させられたオリゴサッカライド部分を含み得るので、例えば、レクチンによる炭水化物の結合を可能にする条件下で、酵素（またはA T Pの生合成因子）の適切な固定化レクチンへの結合のようなアフィニティ技術が、特に有用なアフィニティ技術であり得る。

【0093】

他の有用なアフィニティ技術として、特異的なタンパク質またはポリペプチド抗原（例えば、酵素またはA T Pの生合成因子）を単離および/または検出するための免疫学的技術が挙げられる。この技術は、抗原についての抗体結合部位と因子上に存在する抗原性決定基との間での特異的結合相互作用による。抗体または他のアフィニティ試薬の、抗原に対する結合は、結合相互作用が、約 10^4 M^{-1} より大きいかまたはそれと同等の K_a 、好ましくは、約 10^5 M^{-1} より大きいかまたはそれと同等の K_a 、より好ましくは、約 10^6 M^{-1} より大きいかまたはそれと同等の K_a 、そしてなおより好ましくは、約 10^7 M^{-1} より大きいかまたはそれと同等の K_a を有する場合に、「特異的」である。結合パートナーまたは抗体のアフィニティは、例えば、Scatchardら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949) によって記載されている技術のような従来技術を使用して、容易に決定され得る。

【0094】

免疫学的技術として、免疫アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降、固相免疫吸着、または他の免疫アフィニティ方法が挙げられるが、これらに限定されない。これらおよび他の有用なアフィニティ技術については、例えば、Scopes, R. K., Protein Purification: Principles and Practice, 1987, Springer-Verlag, NY; Weir, D. M., Handbook of Experim

ental Immunology、1986、Blackwell Scientific、Boston;およびHermanson, G.T.ら、Immobilized Affinity Ligand Techniques, 1992、Academic Press, Inc., California (アフィニティ技術を含む、複合体を単離および特徴付けるための技術に関する詳細については、それらの全体において本明細書中で参考として援用されている)を参照のこと。

【0095】

上記に示されるように、変更されたミトコンドリア機能の指標は、例えば、酵素またはATPの生合成因子である、タンパク質もしくはポリペプチドであり得る。タンパク質またはポリペプチドは、修飾されていないポリペプチドであり得るか、または例えば、グリコシル化、リン酸化、脂肪のアシル化(グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー修飾などを含む)、ホスホリパーゼ切断(例えば、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼcによって媒介される加水分解など)、プロテアーゼ切断、脱リン酸化、または任意の他の型のタンパク質の翻訳後修飾(例えば、共有化学結合の形成または切断を含む修飾)によって翻訳後に修飾されているポリペプチドであり得る。

【0096】

(ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアの容量、またはミトコンドリアの数である、変更されたミトコンドリア機能の指標)

特定の実施形態に従うと、本発明は、生物学的サンプル中の変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルをコントロールサンプルと比較する工程を包含する、脊椎動物の被験体中の関節炎の障害についての危険性を同定するための方法に関する。ここでは、変更されたミトコンドリア機能の指標は、ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアの容量、またはミトコンドリアの数の少なくとも1つである。

【0097】

ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアの容量、および/またはミトコンドリアの数を定量するための方法は、当該分野で公知であり、そして例えば、代表的

な生物学的サンプルの定量的な染色を含み得る。代表的には、ミトコンドリアの定量的な染色は、オルガネラ選択的プローブまたは色素（ミトコンドリア選択的試薬（例えば、ミトコンドリア分子成分に結合する蛍光色素（例えば、ノニラクリジンオレンジ、MitoTrackers™、Molecular Probes, Inc., Eugene, OR））またはミトコンドリア内膜の電気化学的電位の関数としてミトコンドリア中に蓄積する電位差測定色素（例えば、Haugland, 1996 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals - 第6版、Molecular Probes, Eugene, ORを参照のこと）を含むがこれに限定されない）を使用して、行われ得る。別の例として、ミトコンドリアの質量、容量、および/または数が、形態学的な分析によって定量され得る（例えば、Cruz-Oriveら、1990 Am. J. Physiol. 258 : L148 ; Schwerzmannら、1986 J. Cell Biol. 102 : 97）。サンプル中のミトコンドリアの質量、容量、および/またはミトコンドリアの数を定量するためのこれらの手段または当該分野で公知の任意の他の手段は、本発明の意図される範囲内である。例えば、ミトコンドリアの密度を計算する目的のためのこのような定量的な決定因子の使用が意図され、そして限定的であるとは意図されない。特定の高度に好ましい実施形態においては、サンプル中のミトコンドリアタンパク質の質量が、周知の手順を使用して決定される。例えば、当業者は、確立された細胞分画技術を使用して、生物学的サンプルから単離されたミトコンドリア画分を容易に調製し得、そしてそれから、当該分野で周知の多数のタンパク質の定量方法論のいずれかを使用して、タンパク質含有量を決定し得る。

【0098】

（ミトコンドリアDNA含有量を含む変更されたミトコンドリア機能の共働指標）

特定の他の特定の実施形態に従うと、本発明は、本明細書中に提供されるような変更されたミトコンドリア機能の指標をいう、変更されたミトコンドリア機能の「共働指標」を意図する。これは、上記に記載されるような変更されたミトコ

ンドリア機能の指標であり得る、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つのさらなるそして異なる指標と同時に決定される。好ましい実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の共働指標は、生物学的サンプル中のミトコンドリアDNA含有量であり得、そして特に好ましい実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の共働指標は、サンプル中の細胞あたりの（または単位全細胞性DNAあたりの）ミトコンドリアDNAの量を含み、そして他の特に好ましい実施形態においては、変更されたミトコンドリア機能の共働指標は、サンプル中のミトコンドリアあたりのミトコンドリアDNAの量を含む。従って、ミトコンドリアDNAの定量は、本発明に従う変更されたミトコンドリア機能の指標であり得ないが、ミトコンドリアDNAの定量は、本明細書中に提供されるような変更されたミトコンドリア機能の共働指標であり得る。

【0099】

ミトコンドリアDNA (mtDNA) 含有量の定量は、以下を含むがこれらに限定されない、この目的のために有用な種々の確立された技術のいずれかによって達成され得る：ミトコンドリアDNA配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用するオリゴヌクレオチドプローブハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (例えば、Millerら、1996 J. Neurochem. 67:1897; Fahyら、1997 Nucl. Ac. Res. 25:3102; 米国特許出願番号第09/098,079号; Leeら、1998 Diabetes Res. Clin. Practice 42:161; Leeら、1997 Diabetes 46(補遺1):175Aを参照のこと)。特に有用な方法は、Fahyら (Nucl. Acids Res. 25:3102, 1997) によって、そしてGhoshら (Am. J. Hum. Genet. 58:325, 1996) によって開示されているプライマー伸長アッセイである。適切なハイブリダイゼーション条件は、引用されている参考文献において見出され得るか、または選択される特定の核酸標的およびオリゴヌクレオチドプローブに従って; 当業者に周知の方法論を使用して変更され得る (例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1

987; Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、1989を参照のこと)。

【0100】

標的配列に対するプライマーの特異的なハイブリダイゼーションに基づく、サンプル中に存在する特異的な核酸の標的配列(例えば、mtDNA)の量を決定するための他の有用な技術の例として、以下が挙げられる: 標的核酸配列の特異的増幅および増幅産物の定量(ポリメラーゼ連鎖反応を含むがこれらに限定されない)(PCR、Gibbsら、Nucl. Ac. Res. 17:2437、1989)、転写増幅システム(例えば、Kwohら、1989、Proc. Nat. Acad. Sci. 86:1173); 鎖置換増幅(例えば、Walkerら、Nucl. Ac. Res. 20:1691、1992; Walkerら、Proc. Nat. Acad. Sci. 89:392、1992)、および自己維持配列の複製(3SR、例えば、Ghoshら、Molecular Methods for Virus Detection、1995 Academic Press, NY、287~314頁; Guatelliら、Proc. Nat. Acad. Sci. 87:1874、1990を参照のこと)。これらに引用された参考文献は、それらの全体において参考として本明細書中で援用されている。他の有用な増幅技術として、例えば、リガーゼ連鎖反応(例えば、Barany、Proc. Nat. Acad. Sci. 88:189、1991)、Q-βレプリカーゼアッセイ(Cahillら、Clin. Chem. 37:1482、1991; Lizardiら、Biotechnol. 6:1197、1988; Foxら、J. Clin. Lab. Analysis 3:378、1989)、および環化プローブ技術(例えば、Cloneyら、Clin. Chem. 40:656、1994)、ならびに当業者に公知の他の適切な方法が挙げられる。

【0101】

プライマー伸長アッセイ産物の配列の長さまたは分子量が、当業者が精通している核酸配列の大きさを特徴付けるための任意の公知の方法を使用して決定され

得る。好ましい実施形態においては、プライマー伸長産物は、ゲル電気泳動によって特徴付けられる。別の実施形態においては、プライマー伸長産物は、質量分析(MS)によって特徴付けられる。これはさらに、マトリックスアシスティッドレーザーデソーブションイオン化/飛行時間型(MALDI-TOF)分析、または当業者に公知の他のMS技術を含み得る。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号を参照のこと。別の実施形態においては、プライマー伸長産物は、液体またはガスクロマトグラフィーによって特徴付けられ、これはさらに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)、または他の周知のクロマトグラフィー方法論を含み得る。

【0102】

従って、ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアの数、ミトコンドリアの容量、およびミトコンドリアDNAの含有量に関する変更されたミトコンドリア機能の意図される指標または共働指標はまた、ミトコンドリアの複製、ミトコンドリアの転写、および翻訳などの決定を含み得るが、必ずしもこれらに限定されない。

【0103】

(上昇した細胞内カルシウムまたは変更されたミトコンドリア膜電位に対する細胞性の応答である、変更されたミトコンドリア機能の指標)

本発明の特定の局面は、それが、変更されたミトコンドリア機能の指標と関節炎の障害との相関関係に関係する場合には、細胞内カルシウムの恒常性および/またはこの恒常性の摂動に対する細胞性の応答(生理学および病態生理学的なカルシウムの調節を含む)をモニターすることを含む。特に、これらの局面に従って、本発明の方法は、被験体中の関節炎の障害についての危険性を同定することに関する。これは、被験体に由来する生物学的サンプル中の上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答をコントロールの被験体のものに対して比較することによる。上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答の範囲は、このような応答の検出のための方法および試薬が広範であるので、広範である。多くの特異的な細胞性の応答が、当業者に公知である;これらの応答は、選択された生

物学的サンプル中に存在する特定の細胞型に依存する。上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答を比較することによる、関節炎の障害についての危険性を同定するための方法を提供することが、本発明の意図の範囲内である。ここでは、このような応答は、本明細書中で提供されるような、変更されたミトコンドリア機能の指標である。非限定的な例として、上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答は、特異的な分泌産物の分泌、特定の予め形成される成分のエキソサイトーシス、増大したグリコーゲンの代謝、および細胞の増殖が挙げられる（例えば、Clapham、1995 Cell 80:259; Cooper、The Cell - A Molecular Approach、1997 ASM Press、Washington, D.C.; Alberts, B., Bray, D., ら、Molecular Biology of the Cell、1995 Garland Publishing, NYを参照のこと）。

【0104】

簡単な背景として、ミトコンドリア内 Ca^{2+} の正常な変更は、正常な代謝の調節に関係する（Dykens, 1998、Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases, Beal, Howell およびBodis-Wollner編、Wiley-Liss、New York、29-55頁; Radiら、1998、Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases, Beal, Howell and Bodis-Wollner編、Wiley-Liss, New York, 57-89頁; GunterおよびPfeiffer、1991、Am. J. Physiol. 27:C755; Gunterら、1994、Am. J. Physiol. 267:313）。例えば、ミトコンドリアの遊離の Ca^{2+} の変動レベルは、酵素の好気性の調節（Cromptonら、1993 Basic Res. Cardiol. 88:513-523）およびグリセロホスフェートシャトル（Gunterら、1994 J. Bioenerg. Bioembr. 26:471）を通じて、増大したATPの利用に応答して、酸化

的代謝の調節を担い得る。

【0105】

正常なミトコンドリア機能として、ミトコンドリアマトリックス内の過剰の Ca^{2+} の隔離による細胞質ゾル性の遊離のカルシウムレベルの調節が挙げられる。細胞の型に依存して、細胞質ゾル性の Ca^{2+} 濃度は、代表的には、50 ~ 100 nM である。正常な機能性の細胞においては、 Ca^{2+} レベルが 200 ~ 300 nM に達すると、ミトコンドリアは、ミトコンドリア内膜中の Ca^{2+} ユニポーターを介する流入と、 Na^{+} 依存性および Na^{+} 非依存性のカルシウムキャリアの両方を介する Ca^{2+} の流出との間の平衡の機能として、 Ca^{2+} の蓄積を開始する。特定の例においては、細胞内カルシウムの恒常性のこのような摂動は、カルシウムの調節の不全が、変更されたミトコンドリア機能の原因であるかまたは結果であるかにはかかわらず、変更されたミトコンドリア機能に関連している疾患（例えば、関節炎の障害）に特徴的である。

【0106】

従って、上昇したミトコンドリアカルシウムレベルは、上記のように、細胞質ゾルの遊離のカルシウムにおける最初の上昇に応答して蓄積し得る。減少した ATP またはミトコンドリアの病理学に関係する他の症状と組合せたこのような上昇したミトコンドリアのカルシウム濃度は、ミトコンドリアの内膜電位の崩壊を導き得る（Gunter ら、1998 Biochim. Biophys. Acta 1366 : 5 ; Rottenberg および Marbach、1990、Biochim. Biophys. Acta 1016 : 87 を参照のこと）。一般的には、個体における関節炎の障害についての危険性を同定するために本発明の方法を実施するためには、生物学的サンプル中の Ca^{2+} のミトコンドリア外（細胞質ゾル）レベルが、ミトコンドリア内に存在するレベルよりも高い。関節炎の障害の場合には、ミトコンドリアまたは細胞質ゾルのカルシウムレベルは、上記の範囲から変化し得、そして約 1 nM から約 500 mM まで、より代表的には、約 10 nM から約 100 μM まで、そして通常は約 20 nM から約 1 μM までの範囲であり得る。ここでは、「約」は、 $\pm 10\%$ を示す。種々のカルシウムの指標が、当該分野で公知であり、これは、例えば、fura-2 (McCor

mackら、1989、Biochim. Biophys. Acta 973: 420); mag-fura-2; BTC (米国特許第5,501,980号); fluo-3、fluo-4、および fluo-5N (米国特許第5,049,673号); rhod-2; ベンゾチアザ-1; およびベンゾチアザ-2 (これらの全てが、Molecular Probes, Eugene, ORから入手可能である)を含む。細胞内カルシウムをモニターするためのこれらまたは任意の他の手段は、関節炎の障害についての危険性を同定するための本発明の方法に従って意図される。

【0107】

上昇した細胞内カルシウムに対する細胞性の応答である変更されたミトコンドリア機能の指標をモニターするために、 Ca^{2+} の増大した細胞質濃度およびミトコンドリア濃度を誘導する化合物(カルシウムイオノフォアを含む)が、細胞内カルシウムを測定するための方法であるとして、当業者に周知である(例えば、GunterおよびGunter、1994 J. Bioenerg. Biomembr. 26:471; Gunterら、1998 Biochim. Biophys. Acta 1366:5; McCormackら、1989 Biochim. Biophys. Acta 973:420; OrreniusおよびNicotera、1994、J. Neural. Transm. 補遺、43:1; LeistおよびNicotera、1998 Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 132:79; およびHaugland、1996 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals - 第6版、Molecular Probes, Eugene, ORを参照のこと)。従って、当業者は、本発明の開示および周知の方法に従って、本発明における使用のための細胞内カルシウムを検出するための、適切なイオノフォア(または、 Ca^{2+} の細胞質内および/もしくはミトコンドリア内の濃度の増大を生じる別の化合物)および適切な手段を、容易に選択し得る。

【0108】

ミトコンドリア内への Ca^{2+} の流入は、電子の移動によってミトコンドリア内

膜で確立され得るネガティブな膜貫通電気化学的電位 ($\Delta\Psi$) に大きく依存性であり、そして完全に依存するようであり得、そしてそのような流入は、8 倍の Ca^{2+} 濃度勾配が課された場合でも、 $\Delta\Psi$ の非存在下ではなお生じることができない (Kapus ら、1991 F E B S L e t t . 282 : 61)。従って、ミトコンドリアは、2, 4 - ジニトロフェノールおよびシアン化カルボニル p - トリフルオロ - メトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) のような脱共役剤を用いて生じるように、膜電位が分散される場合に Ca^{2+} を放出し得る。従って、本発明の特定の実施態様に従うと、 $\Delta\Psi$ の崩壊は、関節炎の障害を有している被験体の細胞によって経験されたものを含む、特定の生理学的条件下で生じ得る、ミトコンドリア内への細胞質ゾルの遊離のカルシウムの流入によって、強化され得る。このような崩壊の検出は、本明細書中で提供されるような種々の手段によって達成され得る。

【0109】

本発明の特定の関連する実施態様においては、変更された (例えば、増大したかまたは減少した) ミトコンドリアの膜電位が、変更されたミトコンドリア機能の指標であり得る。代表的には、ミトコンドリアの膜電位は、当業者に容易に知られている方法に従って決定され得る。これらには、以下が含まれるが、これらに限定されない：蛍光指標のような検出可能な化合物の検出および / または測定、光学的なプローブ、および / または感受性の pH、ならびにイオン選択性電極 (例えば、Ernster ら、1981 J . C e l l B i o l . 91 : 227 s および引用される参考文献を参照のこと、Haugland、1996 H a n d b o o k o f F l u o r e s c e n t P r o b e s a n d R e s e a r c h C h e m i c a l s 第6版、Molecular Probe s , Eugene , OR、266 - 274 頁および589 - 594 頁をもまた参照のこと)。例えば、例示であって限定的ではないが、蛍光プローブである、2, 4 - ジメチルアミノスチリル - N - メチルピリジニウム (DASPMI) およびテトラメチルローダミンエステル (例えば、テトラメチルローダミンメチルエステル、TMRM ; テトラメチルローダミンエチルエステル、TMRE)、または関連する化合物 (例えば、Haugland、1996、前出) が、ミトコン

ドリア膜電位に依存しそしてそれに対して比例するプロセスであるミトコンドリア中での蓄積の後に定量し得る(例えば、Murphyら、1998、Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Disease、Beal, HowellおよびBodis-Wollner編、Wiley-Liss、New York、159-186頁およびその中で引用されている参考文献; ならびに、Molecular Probes On-line Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、<http://www.probes.com/handbook/toc.html>を参照のこと)。本発明において使用され得る他の蛍光の検出可能な化合物として、以下が挙げられるがこれらに限定されない: ローダミン123、ローダミンBヘキシルエステル、DiOC₆(3)、JC-1[5, 5', 6, 6'-テトラクロロ-1, 1', 3, 3'-テトラエチルベンズイミダゾール-カルボシアニオンイオダイド](Cossarizzaら、1993 Biochem. Biophys. Res. Comm. 197:40; Reersら、1995 Meth. Enzymol. 260:406)、rhod-2(米国特許第5,049,673号を参照のこと; 上記の化合物の全てが、Molecular Probes, Eugene, Oregonから入手可能である)およびローダミン800(Lambda Physik, GmbH, Göttingen, Germany; Sakanoueら、1997, J. Biochem. 121:29)。ミトコンドリアの膜電位をモニターするための方法はまた、米国特許出願番号第09/161,172号にも開示されている。

【0110】

ミトコンドリアの膜電位はまた、蛍光ではない手段によって、例えば、TTP(テトラフェニルホスホニウムイオン)およびTTP-感受性電極を使用することによって、測定され得る(Kamoら、1979 J. Membrane Biol. 49:105; PorterおよびBrand, 1995 Am. J. Physiol. 269:R1213)。当業者は、 $\Delta\Psi_m$ を測定するための、適切な検出可能な化合物または他の適切な手段を選択することが可能である。例

示であって、限定的ではないが、TMRMはTMREよりもいくらか好ましい。なぜなら、ミトコンドリアからの流出後に、TMREは、TMRMよりも、小胞体および細胞質中にわずかにより残存しているシグナルを生じるからである。

【0111】

別の限定的ではない例として、膜電位は、検出可能に荷電した溶質に対して、ミトコンドリアの浸透性の直接の測定によって、分光学的な定量または蛍光による定量と組み合わせて、マトリックスの容量および/またはピリジンヌクレオチドの還元の決定を使用して、さらにまたは代替的に計算され得る。ミトコンドリア内膜を通過する膜電位依存性の基質交換拡散の測定もまた、膜電位の間接的な測定を提供し得る。(例えば、Quinn、1976、The Molecular Biology of Cell Membranes、University Park Press、Baltimore、Maryland、2000-217頁、およびその中で引用されている参考文献を参照のこと)。

【0112】

上記に記載されているような、細胞内カルシウムの上昇によって生じる Ca^{2+} の通常ではないミトコンドリアでの蓄積に対する鋭い感受性もまた、関節炎の障害の特徴であり得る。このようなミトコンドリアの感受性は、本発明に従う変更されたミトコンドリア機能の指標を提供し得る。さらに、種々の生理学的に関連する試薬(ヒドロペルオキシドおよびフリーラジカルを含む)は、 $\Delta\Psi$ の崩壊を誘導するように Ca^{2+} と共働作用し得る(Novgorodovら、1991 Biochem. Biophys. Acta 1058:242; Takeyamaら、1993 Biochem. J. 294:719; Guidoxら、1993 Arch. Biochem. Biophys. 306:139)。従って、上昇した細胞内カルシウムまたは変更されたミトコンドリアの膜電位に対する細胞性の応答である、変更されたミトコンドリア機能の指標の限定的ではない例として、ミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)アッセイ(同時係属中の米国特許出願番号第60/140,433号に記載されている)およびミトコンドリアの浸透性転移(MPT)アッセイ(同時係属中の米国特許出願番号第09/161,172号に記載されている)が挙げられる。

【0113】

アポトーシス誘導因子の刺激に対する細胞性の応答である、変更されたミトコンドリア機能の指標

別の局面に関して、本発明は、プログラムされた細胞死またはアポトーシスを含む、変更されたミトコンドリア機能の指標との関節炎の障害の相関関係に関する。特に、この局面に従うと、本発明は、以下に由来する生物学的サンプル中でのアポトーシスを誘導する（「アポトーシス誘導性の（apoptogenic）」）刺激に対する細胞性の応答を比較する工程を包含する方法に関する：（i）関節炎の障害についての危険性が考えられる被験体、および（ii）コントロールの被験体。種々の公知のアポトーシス誘導性の刺激に対する細胞性の応答の範囲は、このような応答の検出のための方法および試薬の範囲と同様、広範である。アポトーシス誘導性の刺激に対する細胞性の応答を比較することによって、関節炎の障害についての危険性を同定するための方法を提供することは、本発明の意図に含まれる。ここでは、このような応答は、本明細書中で提供されるように、変更されたミトコンドリア機能の指標である。

【0114】

上記に示されるように、ミトコンドリア不全および/または関連する上昇したROSレベルは、種々の細胞型においてアポトーシスを誘導する最初の事象を開始し得る（Kroemerら、FASEB J. 9:1277-87、1995；Zamzamiら、J. Exp. Med. 182:367-77、1995；Zamzamiら、J. Exp. Med. 181:1661-72、1995；Aussererら、Mol. Cell. Biol. 14:5032-42、1994）。いくつかの細胞型においては、ミトコンドリアの膜電位（ $\Delta\psi_m$ ）の低下は、アポトーシスに伴う核DNAの分解の前に起こる。細胞を含まないシステムにおいては、核ではなくミトコンドリアを富化された画分が、核のアポトーシスを誘導し得る（Newmeyerら、Cell 70:353-64、1994）。上昇した細胞内ROSのような変更された細胞の代謝状態を導くミトコンドリアの呼吸活性の摂動は、関節炎の障害において生じ得、そしてさらに、アポトーシスの機構を通じる病理学的な事象を誘導し得る。

【0115】

酸化ストレスを受けたミトコンドリアは、アポトーシスに先行する事象である、染色体の濃縮を誘導し得る予め形成された可溶性の因子を放出し得る (Marchettiら、Cancer Res. 56:2033-28、1996)。さらに、抗アポトーシス遺伝子産物のBcl-2ファミリーのメンバーは、ミトコンドリアの外膜内に配置され (Monaghanら、J. Histochem. Cytochem. 40:1819-25、1992)、そしてこれらのタンパク質は、酸化ストレスから膜を保護するようである (Korsmeyerら、Biochim. Biophys. Acta. 1271:63、1995)。Bcl-2のこの膜に対する局在化は、アポトーシスの調節のために不可欠であるようである (Nguyenら、J. Biol. Chem. 269:16521-24、1994)。このように、ミトコンドリアの生理学における変化は、アポトーシスの重要な媒介因子であり得る。

【0116】

従って、本発明の開示に従って被験体中の関節炎の障害の危険性を同定するために使用され得るような、変更されたミトコンドリア機能は、アポトーシス誘導因子によるアポトーシスの誘導に対する低い限界であり得る。種々のアポトーシス誘導因子が当業者に公知であり (例えば、Greenら、1998 Science 281:1309およびその中で引用されている参考文献を参照のこと)、そして例えば以下を含み得るがこれらに限定されない: 当業者がよく知っている適切な条件下で細胞に対して添加される場合には、腫瘍壊死因子、FasL、グルタミン酸、NMDA、IL-1、IL-3、コルチコステロン、ミネラルコルチコイド、またはグルココルチコイドレセプター (単数または複数) のような特異的なレセプターを必要とするアポトーシス誘導因子。アポトーシス誘導因子としてさらに、以下が挙げられ得る: ヘルビマイシンA、(Manciniら、1997、J. Cell. Biol. 138:449-469); パラコート (Costantiniら、1995、Toxicology 99:1-2)、エチレングリコール; プロテインキナーゼインヒビター (例えば、スタウロsporin、カスホスチンC、コーヒー酸フェネチルエステル、キレリチンクロライ

ド、ゲニステイン) ; 1 - (5 - イソキノリンスルホニル) - 2 - メチルピペラジン ; N - [2 - ((p - ブロモシンナミル) アミノ) エチル] - 5 - 5 - イソキノリンスルホンアミド ; KN - 93 ; クエリシチン ; d - エリスロ - スピングシン誘導体 ; UV照射 ; イオノフォア (例えば、イオノマイシン、バリノマイシン、および他の当該分野で公知のイオノフォア) ; MAPキナーゼインデューサー (例えば、アニソマイシンおよびアナンダミンのような) ; 細胞周期ブロッカー (例えば、アピジコリン、コルセミド、5 - フルオロウラシル、およびホモハリングトニンのような) ; アセチルコリンエステラーゼインヒビター (例えば、ベルベリンのような) ; 抗エストロゲン (例えば、タモキシフェンのような) ; 酸化促進剤 (例えば、tert - ブチルヒドロペルオキシド、ペルオキシニトライト、過酸化水素、および一酸化窒素ドナー (L - アルギニン、5 , 5 ' - ジニトロソジチオール、N - ヒドロキシ - L - アルギニン、S - ニトロソ - N - アセチルペニシルアミン、S - ニトロソグルタチオン、NOR - 1、NOR - 3、NOR 4、4 - フェニル - 3 - フロキサソカルボニトリル、3 - モルホリノシンドノンイミン、ニトロプルシドナトリウム、およびストレプトゾトシンを含むがこれに限定されない) のような) グルタチオン枯渇剤 (例えば、エタクリン酸のような) (Meister、1995 Bichim. Biophys. Acta . 1271 : 35) ; フリーラジカル (例えば、硝酸のような) ; 無機金属イオン (例えば、カドミウムのような) ; DNA合成のインヒビター (例えば、アクチノマイシンDのような) ; DNAインターカレーター (例えば、ドキソルビシン、硫酸ペロマイシン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、マイトマイシンC、カンプトセシン、およびダウノルビシン ; タンパク質合成のインヒビター (例えば、シクロヘキシミド、プロマイシン、およびラパマイシンのような) ; 微小管の形成または安定性に影響を与える試薬 (例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、コルヒチン、4 - ヒドロキシフェニルレチナミド、およびパクリタキセルなど) ; ならびに他のMPTインデューサー (例えば、Baxタンパク質 (Jurgenmeierら、1998 PNAS 95 : 4997 - 5002) 、カルシウムおよび無機リン酸 (Kroemerら、1998 Ann. Rev. Physiol. 60 : 619)) 。

【0117】

変更されたミトコンドリア機能の指標がアポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答である本発明の方法の1つの実施態様においては、アポトーシスを受けていると疑われる生物学的サンプル中の細胞が、形態学的変化、浸透性の変化、またはアポトーシスの状態の指標である他の変化について試験され得る。例えば、例示であって限定的ではないが、多くの細胞型におけるアポトーシスは、血漿膜の気泡、細胞の形状の変化、基質の接着特性の欠失、または例えば、光学顕微鏡を使用することによって当業者によって容易に検出され得る他の形態学的変化のような、変更された形態学的な表現を生じ得る。別の例として、アポトーシスを受けている細胞は、染色体の断片化および崩壊を示し得、これは、顕微鏡によって、そして/または当該分野で公知であるDNA特異的またはクロマチン特異的色素（蛍光色素を含む）の使用を通じて、明らかであり得る。このような細胞はまた、生命体の色素（例えば、ヨウ化プロピジウム、トリパンブルー）の使用を通じて、または細胞内環境への乳酸デヒドロゲナーゼの漏出の検出によって、容易に検出され得るので、変更された血漿膜の浸透性の特性を示し得る。形態学的な基準、変更された血漿膜の浸透性、および関連する変化による、これらおよび他のアポトーシス細胞を検出するための手段は、当業者に明らかである。

【0118】

変更されたミトコンドリア機能の指標がアポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答である本発明の方法の別の実施態様においては、生物学的サンプル中の細胞が、血漿膜の内のリーフレットから外のリーフレットへの細胞膜のホスファチジルセリン（PS）の局在化についてアッセイされ得る。これは、例えば、PS特異的タンパク質のであるアネキシンによる外部のリーフレットへの結合を測定することによって検出され得る。（Martinら、J. Exp. Med. 182: 1545、1995；Fadokら、J. Immunol. 148: 2207、1992）。本発明のこの局面のなお別の実施態様においては、アポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答が、カスパーゼとして公知のアポトーシスによって活性化されるプロテアーゼのファミリーの任意のメンバーにおける特異的なプロテアーゼ活性の誘導についてのアッセイによって決定される（例えば、Gr

eenら、1998 *Science* 281:1309を参照のこと)。当業者は、例えば、特異的に認識されるタンパク質基質のカスパーゼによって媒介される切断の決定によるカスパーゼ活性を決定する方法をよく知っている。これらの基質として、例えば、当該分野で公知であるカスパーゼによって切断される、ポリ-(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)または他の天然に存在するかもしくは合成のペプチドおよびタンパク質が挙げられ得る(例えば、Ellerbyら、1997 *J. Neurosci.* 17:6165を参照のこと)。合成のペプチドZ-Tyr-Val-Ala-Asp-AFC(配列番号)(ここでは、「Z」は、ベンゾイルカルボニル部分を示し、そしてAFCは7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(Kluckら、1997 *Science* 275:1132; Nicholsonら、1995 *Nature* 376:37)を示す)が1つのこのような基質である。基質の他の限定的ではない例として、U1-70kDaおよびDNA-PKcsのような核タンパク質が挙げられる(RosenおよびCasciola-Rosen、1997、*J. Cell Biochem.* 64:50; Cohen, 1997 *Biochem. J.* 326:1)。

【0119】

上記に記載されるように、ミトコンドリアの内膜は、多くの小さい溶質について高い選択性および調節された浸透性を示し得るが、大きい(>約10kDa)の分子については不浸透性である(例えば、Quinn、1976 *The Molecular Biology of Cell Membranes*, University Park Press, Baltimore, Marylandを参照のこと)。しかし、アポトーシスを受けている細胞においては、ミトコンドリアの膜電位の崩壊は、浸透性の増大が伴い得、これはミトコンドリア膜を通過するマクロ分子の拡散を可能にする。従って、変更されたミトコンドリア機能の指標がアポトーシス誘導因子に対する細胞性の応答である本発明の別の実施態様においては、ミトコンドリアタンパク質(例えば、チトクロームcまたは膜間空間のタンパク質(これは、アポトーシス細胞中のミトコンドリアから脱出した))の検出が、容易に決定され得るアポトーシス誘導因子に対する応答の

証拠を提供し得る (L i uら、C e l l 86:147、1996)。チトクロームcのこのような検出は、分光光学的に、免疫化学的に行われ得るか、または特異的なタンパク質の存在を決定するための十分に確立された方法によって行われ得る。

【0120】

例えば、続いて、アポトーシスの刺激 (例えば、周知のカルシウムイオノフォアであるイオノマイシン) でチャレンジされた細胞からのチトクロームcの放出の後に、種々の免疫学的方法が行われ得る。親和性による捕捉と組合せたM a t r i xによって補助されるレーザー吸収イオン化飛行時間 (M A L D I - T O F) 質量スペクトル分析は、アポ - チトクロームcおよびハロ - チトクロームcがそれらの特有の分子量に基づいて区別され得るので、このような分析に特に適切であり得る。例えば、S u r f a c e - E n h a n c e d L a s e r D e s o r p t i o n / I o n i z a t i o n (S E L D I (登録商標)) システム (C i p h e r g e n , P a l o A l t o , C a l i f o r n i a) は、アポトーシス誘導因子で処理された細胞中のミトコンドリアからのチトクロームcの放出を検出するために利用され得る。このアプローチにおいては、固体支持体上に固定されたチトクロームc特異的抗体が、可溶性の細胞抽出物中に存在する、放出されたチトクロームcを捕捉するために使用される。捕捉されたタンパク質は、次いで、エネルギー吸収分子 (E A M) のマトリックス中に入れられ、そしてパルスされたレーザーの励起を使用して固体支持体の表面から脱着させられる。タンパク質の分子量は、S E L D I (登録商標) 質量スペクトル分析計の検出装置についてその飛行の時間によって決定される。

【0121】

当業者は、アポトーシスを定量するための他の適切な技術が存在し得ること、およびアポトーシスの刺激に対する細胞性の応答である変更されたミトコンドリア機能の指標を決定する目的のためのこのような技術が、本発明によって提供される方法の範囲内であることを容易に理解する。

【0122】

(変更されたミトコンドリア機能の指標としてのフリーラジカルの産生)

本発明の特定の実施態様においては、生物学的サンプル中でのフリーラジカルの産生は、変更されたミトコンドリア機能の指標として検出され得る。ミトコンドリアは、生物学的システム中のフリーラジカルの主な供給源である（例えば、Murphyら、1998、Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Disease、Beal, HowellおよびBodis-Wollner編、Wiley-Liss、New York、159-186頁およびその中で引用されている参考文献を参照のこと）が、本発明は、そのようには限定されるべきではなく、そしてフリーラジカルの産生は、特定の亜細胞性の供給源の部位にかかわらず、変更されたミトコンドリア機能の指標であり得る。例えば、フラビン結合オキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、または一酸化窒素シンターゼのような酵素によって触媒される反応を通じて過酸化水素、一酸化窒素、またはスーパーオキシドラジカルのような代謝産物の産生を通じてラジカルの形成を導く、多数の細胞内の生化学的経路が、このようなラジカルを検出するための方法であるとして、当該分野で公知である（例えば、Kelver、1993 Crit. Rev. Toxicol. 23:21; Halliwell B. および J. M. C. Gutteridge、Free Radicals, in Biology and Medicine, 1989 Clarendon Press, Oxford, UK; Davies, K. J. A. および F. Ursini、The Oxygen Paradox, Cleup Univ. Press, Padova, ITを参照のこと）。ETCの任意の工程が不全であるような、変更されたミトコンドリア機能もまた、高度に反応性のフリーラジカルの生成を導き得る。上記に示されるように、変更されたミトコンドリア機能によって生じるラジカルとして、反応性の酸素種（ROS）（例えば、スーパーオキシド、ペルオキシナイト、およびヒドロキシルラジカル）、および細胞に対して毒性であり得る可能性のある他の反応性の種が挙げられる。従って、本発明の特定の好ましい実施態様においては、変更されたミトコンドリア機能の指標は、生物学的サンプル中に存在する検出可能なフリーラジカル種であり得る。特定の特に好ましい実施態様においては、検出可能なフリーラジカルはROSである。

【0123】

変更されたミトコンドリア機能の指標として有用であり得るフリーラジカルを検出するための方法は当該分野で公知であり、そして特定のラジカルに依存する。代表的には、生物学的サンプル中でのフリーラジカルの産生のレベルは、当業者がよく知っている方法に従って決定され得、これには、以下の検出および/または測定が含まれるがこれらに限定されない：グリコキシド化産物（ペントシジン、カルボキシメチルリジン、およびピロリンを含む）；リポキシド化産物（グリオキサル、マロンジアルデヒド、および4-ヒドロキシノネナルを含む）；チオバルビツール酸反応性基質（TBARS；例えば、Steinbrecherら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3882；Wolff、1993 Br. Med. Bull. 49:642を参照のこと）、ならびに/または他の化学的な検出手段（例えば、ヒドロキシルラジカルのサリチル酸のトラッピング）（例えば、Ghiselliら、1998、Meths. Mol. Biol. 108:89；Halliwellら、1997 Free Radic. Res. 27:239）、または特異的な付加物の形成（例えば、Mecocciら、1993 Ann. Neurol. 34:609；Giuliviら、1994、Meths. Enzymol. 233:363を参照のこと）（マロンジアルデヒドの形成、タンパク質のニトロシル化、DNAの酸化（ミトコンドリアDNAの酸化を含む）、8'-OH-グアノシン付加物（例えば、Beckmanら、1999、Mutat. Res. 424:51）、タンパク質の酸化、タンパク質のカルボニル修飾（例えば、Baynesら、1991 Diabetes 40:405；Baynesら、1999 Diabetes 48:1）；電子スピン共鳴（ESR）プローブを含む）；環状のボルタメトリ（voltametry）；蛍光および/または化学発光指標（例えば、Greenwald, R. A. (編)、Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, 1985 CRC Press, Boca Raton, FL；Acworth and Bailey (編)、Handbook of Oxidative Metabolism, 1995 ESA, Inc., Chelmsfo

rd, MA; Yla-Herttuala, 1989, J. Clin. Invest. 84:1086; Velazques, 1991 Diabetic Medicine 8:752; Belch, 1995, Int. Angiol. 14:385; Sato, 1979 Biochem. Med. 21:104; Traverso, 1998 Diabetologia 41:265; Haugland, 1996 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals - 第6版, Molecular Probes, Eugene, OR, 483-502頁、およびそれらの中で引用されている参考文献をもまた、参照のこと)。例えば、例示のためであって限定的ではないが、蛍光プローブであるジクロロジヒドロフルオレセインジアセタンおよびそのカルボキシル化誘導体であるカルボキシジクロロジヒドロフルオレセインジアセタンの酸化（例えば、Haugland, 1996、前出）は、反応性の酸素種の存在に依存しそしてそれと比例するプロセスであり、細胞中での蓄積後、定量され得る（例えば、Molecular Probes On-line Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、<http://www.probes.com/handbook/toc.html>をもまた、参照のこと）。フリーラジカルの産生の検出のために本発明において使用され得る他の蛍光の検出可能な化合物として、ジヒドロローダミンおよびジヒドロサミン誘導体、cis-パリナリン酸、レゾルフィン誘導体、ルシゲニン、および当業者に公知であり得る任意の他の適切な化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0124】

このように、上記にもまた記載されているように、フリーラジカルによって媒介される損傷は、ETCの無数のタンパク質の1つ以上を不活化し得、そしてそのように不活化されたものは、酸化リン酸化およびATPの産生について応答性であるミトコンドリアの化学的な浸透圧の機構を外れ得る。ATPの産生の決定を含む、ATPの生合成因子である変更されたミトコンドリア機能の指標が、本明細書中でさらに詳細に記載される。ミトコンドリア機能の完全性に対するフ

リーラジカルによって媒介される損傷はまた、変更されたミトコンドリア機能に関連する複数の機構のわずかに1つの例である。これは、ミトコンドリアの内膜によって維持される電気化学的電位の崩壊を生じ得る。ミトコンドリアの内膜電位における変化を検出するための方法が、上記に、そして同時係属中の米国特許出願番号第09/161,172号に記載されている。

【0125】

(サンプル)

生物学的サンプルは、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標が検出され得る任意の組織または細胞の調製物を含み得る、そして従って、比較される特定の指標（単数または複数）に依存して性質において変化し得る。このように、本明細書中の開示に基づいて当業者に明らかであるように、特定の高度に好ましい実施態様においては、生物学的サンプルは、ミトコンドリアを含有している細胞または細胞調製物を含み、そして特定の他の好ましい実施態様においては、生物学的サンプルは、サブミトコンドリア粒子を含み得る。生物学的サンプルは、被験体または生物学的な供給源に由来する、血液サンプル、生検標本、組織外植片、器官培養物、または任意の他の組織もしくは細胞の調製物を得ることによって提供され得る。被験体または生物学的な供給源は、ヒトはまたはヒト以外の動物、以下を含むがこれらに限定されない初代細胞培養物または培養に適合させられた細胞株であり得る：染色体に組み込まれ得るかまたはエピソーム組換え核酸配列を含有し得る、遺伝子操作された細胞株、固定されたかまたは固定化が可能な細胞株、体細胞ハイブリッド、または細胞質ハイブリッド「サイブリッド」細胞株、分化したかまたは分化可能な細胞株、形質転換された細胞株など。特に好ましい実施態様においては、被験体または生物学的な供給源は、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物であり、そして他の特に好ましい実施態様においては、被験体または生物学的な供給源は、本明細書中に提供されるような脊椎動物に由来する初代細胞培養物または培養に適合させられた細胞株であるが、本発明は必ずしもそのようには限定されない。例示のための非制限的な例として、本発明の特定の実施態様においては、例えば、1つ以上の脊椎動物に由来する遺伝子、遺伝子産物など（例えば、ミトコンドリア分子成分および/または本明細書

中で提供されるようなATPの生合成因子)を含むような組換え遺伝子操作を通じて人工的に操作されている、脊椎動物ではない組織または細胞の調製物であり得る生物学的サンプルが意図される。例えば、多数の酵母および昆虫細胞株の数が、本明細書中に提供されているような関節炎の障害についてのモデルシステムを作成するために、当業者がよく知っている確立された方法に従って、異種脊椎動物に由来する成分を用いて容易に再構成され得る。従って、多数の生物学的サンプルのバリエーションおよび改変が、本発明の意図された範囲および精神のうちである。

【0126】

本発明の特定の他の特に好ましい実施態様においては、被験体または生物学的供給源は、関節炎の障害を有しているかまたは関節炎の障害を有する危険性があると予想され得、そして本発明の特定の好ましい実施態様においては、被験体または生物学的供給源は、このような疾患の危険性または存在を有さないことが公知であり得る。

【0127】

被験体または生物学的な供給源が、関節炎の障害を示す臨床的なパラメーター内に入るかまたはそうではないかを決定することが所望される、特定の他の好ましい実施態様においては、当業者によって受け入れられている、関節炎の徴候および症状(例えば、Primer on the Rheumatic Disease(第7版、J.H.Klippel(編)、1997 The Arthritis Foundation, Atlanta, GA)およびその中で引用されている参考文献において言及されている臨床的な徴候)、または関節炎の障害を診断するための当該分野で公知の他の手段が、被験体または生物学的な供給源をそのように指定するために使用され得る。

【0128】

本発明の特定の局面においては、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標(または、本明細書中で提供されるような共同指標)を含有している生物学的サンプルが、被験体または生物学的な供給源から、そして候補の試薬との被験体または生物学的な供給源の接触の前および後に、例えば、試薬に

対する被験体または生物学的な供給源の暴露の前のレベルと比較して、上記に定義されるような変更されたミトコンドリア機能の指標（つまり共同指標）のレベルにおける変化に影響を与え得る候補の試薬を同定するために、得られ得る。指標が酵素またはATPの生合成因子である特定の好ましい実施態様においては、指標は、必要に応じて、サンプル中の酵素（またはATPの生合成因子）の触媒活性の測定として、サンプル中の酵素（またはATPの生合成因子）の量の測定として、またはサンプル中の酵素（またはATPの生合成因子）の発現レベルの測定として、本明細書中に記載されているように、決定され得る。

【0129】

本発明の最も好ましい実施態様においては、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標を含有している生物学的サンプルは、軟骨細胞を含み、そしてなおより好ましくは、関節の軟骨細胞を含む。軟骨細胞は、例えば、正常な成熟軟骨組織から得ることができる。例えば、米国特許第4,846,835号、および同第5,041,138号は、コラゲナーゼ溶液中で関節の軟骨を消化すること、続いて、インビトロで軟骨細胞を有糸分裂によって拡大させることによる、軟骨細胞の単離を開示している。本発明の別の好ましい実施態様においては、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標を含有している生物学的サンプルは、軟骨細胞から誘導されたマトリックス小胞（MV）（例えば、Anderson, 1988 Rheum. Dis. Clin. North Amer. 14:303; Doyle, 1982 J. Pathol. 136:199; Doherty, 1994 Hosp. Pract. Off. Ed. 29:93）、例えば、多数の確立された手順の任意のものに従って調製されたMV（例えば、Johnsonら、1999 J. Bone Miner. Res. 14:883）または当業者がよく知っている他の技術によって調製されたMVを含み得る。

【0130】

軟骨細胞による、および骨芽細胞によるマトリックスの石灰化の開始は、マトリックス小胞（MV）として公知の膜によって限定される細胞のフラグメントの放出によって媒介されるようである。MV成分（種々の酵素を含む）は、細胞外

マトリックスを改変し、そしてMV内部は、ヒドロキシアパタイトの結晶の形成のための保護された環境に役立つ (Anderson, Clin. Orthopaed. Rel. Res. 314:266-280、1995; Boskeyら、Calcif. Tissue Int. 60:309-315、1997; Boskey, Connect. Tissue Res. 35:357-363、1996; およびGoldberg, Prog. Histochem. Cytochem. 31:1-187、1996)。MVを調製する方法は本明細書中に記載されており、そして他の方法が当該分野で公知である (例えば、Johnsonら、J. Bone Miner. Res. 14:883-892、1999、および米国特許第5,656,450号を参照のこと)。

【0131】

ミトコンドリアおよびSMPは、種々の方法によって調製され得る (例えば、Fleischerら、Methods Enzymol. 31:292-299、1974; Pedersenら、Methods Cell Biol. 20:411-481、1978; della-Cioppaら、Mol. Cell. Endocrinol. 48:111-120、1986; およびLauguinら、Bichim. Biophys. Acta. 460:331-345、1977を参照のこと)。例えば、ミトコンドリアおよび/またはSMPを調製するために、以下の手順を使用し得る。細胞溶解物を、600gで10分間、4℃で遠心分離し、そしてこの最初の上清を回収し、そして取っておく。血漿膜材料を含有しているペレットを、100ulのMSB (210mMのマンニトール、70mMのスクロース、50mMのTris-HCl、pH7.4、および10mMのEDTA) で洗浄し、そして第2の上清を生じるように600gで10分間、4℃で遠心分離した。第1および第2の上清を混合し、そして14,000gで15分間、4℃で遠心分離する; 得られたペレットは、ミトコンドリアを調製するためにMSB中に再懸濁されるミトコンドリア画分を示す。このようなミトコンドリアは、0.25mg/mlのジギトニン (Roche Molecular Biochemicals, 以前のBoehringer Mannheim, Indianapolis, IN) とともに2分間インキュベート

し得、そしてサブミトコンドリア粒子 (S N P) を生じるように、カップ - ホーン (c u p - h o r n) 超音波処理装置中で50%の義務サイクルで3分間超音波処理し得る。

【0132】

従って、本明細書中で提供されるような生物学的サンプルは、特定の好ましい実施態様においては、軟骨細胞、軟骨細胞に由来するMV、および/または軟骨細胞に由来するサブミトコンドリア粒子 (S M P) を含み得、これらにおいて、変更されたミトコンドリア機能の1つ以上の指標のレベルが比較され得る。

【0133】

本発明の別の好ましい実施態様においては、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標を含有している生物学的サンプルは、全血を含み得、そして別の好ましい実施態様においては、全血の粗バフィーコート画分を含み得る。これは、血小板中、および核を有する血液細胞 (例えば、リンパ球、単球、ならびに、好中球、抗酸球、および抗塩基球を含む顆粒球のような白血球) において富化されそして実質的に赤血球を除去された、全血の粒子状の画分をさらに含むことが、当該分野で公知である。当業者は、このようなバフィーコート画分を調製するための方法を知っている。これは、例えば、密度に依存する分離媒体の使用を含む定義された条件化での血液成分の異なる密度沈降によって、または他の方法によって、調製され得る。他の好ましい実施態様においては、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標を含有している生物学的サンプルは、例えば、リンパ球、ポリ多型性核白血球、顆粒球などのような、富化させられたか、単離されたか、または精製された血液細胞のサブ集団の画分を含み得る。特定の造血細胞のサブ集団の選択的な調製のための方法が、当該分野で周知である (例えば、Current Protocols in Immunology, J. E. Coliganら (編)、1998、John Wiley & Sons, NYを参照のこと)。

【0134】

本発明の特定の実施態様に従うと、生物学的サンプルがそれから得られる特定の細胞型または組織型は、一般的な生物学的な供給源の異なる細胞または組織型

から得られる変更されたミトコンドリア機能の対応する候補の指標と比較して、その中に含まれる変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標の定性的または定量的な局面に影響を与え得る。従って、異なった細胞または組織型に由来する生物学的サンプル中での変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの候補の指標を定量することは、それが本発明を関節炎の障害について有利にし、そしてさらに、脊椎動物の被験体中の公知のまたは予想される関節炎の障害の進行の特定の程度について最も有用にし得るので、本発明の意図のうちである。関連する細胞または組織型が、このような疾患の当業者に公知である。

【0135】

例えば、本明細書中に提供されるような、関節の軟骨の軟骨細胞は、酸性エネルギーによる損傷（例えば、ATP要求性）が関節の維持および健全な関節機能のために必要とされる特に好ましい細胞型を示し得る。以下に関係している細胞性の機能のためにミトコンドリアATPを使用する細胞または組織型に由来する他の生物学的サンプルもまた、特に有用であり得る：関節の発達、安定化、維持、および修復プロセス（例えば、軟骨の恒常性、骨、または靭帯の移植片の治療）癒痕組織の再吸収、または結合組織の改造（例えば、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨髄間質細胞、筋細胞、運動神経/終板細胞、炎症性の細胞および/または滑膜細胞）。

【0136】

ミトコンドリアの変更が、特定の疾患状態に寄与し得るか否かを決定するためには、診断試験のため、および核の遺伝的なバックグラウンドが一定に保たれ、一方、ミトコンドリアのゲノムが改変される、候補の治療薬をスクリーニングするための、モデルシステムを構築することが有用であり得る。 ρ^0 細胞を産生するためにミトコンドリアDNAを培養された細胞から除去し、それによってミトコンドリア遺伝子の発現および複製を妨げ、そしてミトコンドリア機能を不活化することが、当該分野で公知である。レシピエント細胞の呼吸の表現形に対するドナーのミトコンドリアの遺伝子型の寄与を評価するために、外来の細胞に由来するミトコンドリアを用いてこのような ρ^0 細胞を再配置することが、さらに当該分野で公知である。異なる生物学的な起源のゲノムおよびミトコンドリアDN

Aを含有しているこのような細胞質ハイブリッド細胞は、サイブリッドとして公知である。例えば、国際公開番号第WO95/26973号、および米国特許第5,888,498号（これらは、それらの全体において本明細書中で参考として援用されている）、ならびにその中で引用されている参考文献を参照のこと。

【0137】

本発明に従うと、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルが、被験体または生物学的な供給源に由来する生物学的サンプル中で決定される。無症状であるか、または関節炎の障害を有しているかまたは関節炎の障害を有する危険性があることについての臨床的な基準を満たす被検体については（例えば、Primer on the Rheumatic Disease, 第7版、J. H. Klippel（編）、1997 The Arthritis Foundation, Atlanta, GAを参照のこと）、このような決定は、予後および/または診断の有用性を有し得る。例えば、関節炎の障害の他の臨床的な指標が公知である場合には、これらの指標の非存在に基づいて関節炎の障害の危険性またはその存在がないことが公知である被験体中の変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルが、このようなレベル（単数または複数）についてのコントロールの範囲を確立するために決定され得る。このレベルはまた、関節炎の障害を有していると疑われるかまたは関節炎の障害を有する危険性がある被験体から得られる生物学的なサンプル中でも決定され得、そして疾患を有していない被験体において決定されたコントロールの範囲と比較され得る。当業者は、特定の被験体、生物学的な供給源、および本明細書中に明確に示されるものよりもはるかに有用である変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較するための基準について任意の数のバリエーションが存在し得、そしてこれらのさらなる使用が、本発明の範囲および精神のうちであることを理解する。

【0138】

例えば、変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルの決定は、日常的な静脈の血液の採血によって被験体から回収された全血に対して、血液もしくは被験体に由来する他の細胞、器官、組織である生物学的サンプルか

ら調製されたバフィーコート細胞に対して、外科手術によって切除された軟骨サンプルについて予後または診断アッセイの形態で行われ得る。あるいは、特定の状況においては、コントロールの被験体または関節炎の障害についての危険性があると疑われる被験体のいずれかに由来するミトコンドリアを使用して、サイブリッド細胞株を構築することが所望され得る。このようなサイブリッドは、診断または予想目的のための変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを決定するために、あるいは処理された細胞中での変更されたミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを変更するそれらの能力に基づいて、関節炎の障害を処置するために適切であり得る試薬を同定するためのスクリーニングアッセイのための生物学的な供給源として、使用され得る。

【0139】

本発明のこの局面の1つの実施形態においては、個々の患者の特定の疾患を効率よく処置するために調整される、治療薬剤または薬剤の組合せが、患者のミトコンドリアを用いて構築されたサイブリッド細胞に対する候補薬剤の慣用的なスクリーニングによって同定され得る。別の実施形態においては、例えば、種々の関節炎の被験体に由来するミトコンドリアを使用して構築されたサイブリッド細胞に対する個々の候補薬剤の異なる効果に基づいて、関節炎の障害のサブタイプを同定するための方法が提供される。

【0140】

1つの実施形態においては、本発明は、関節炎の障害を有する危険性があると疑われる被験体を処置するために適切である薬剤を同定する方法を提供する。この方法は、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較すること、または変化したミトコンドリア機能の共働指標のレベルと、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの異なる指標とを、関節炎の障害を処置するための薬剤の適性を決定するために、候補薬剤の存在下および非存在下で比較することによる。特定の実施形態においては、比較工程は、候補薬剤の存在下および非存在下で、被験体から得られる1つ以上の生物学的なサンプル中で行われ得る。限定的ではないが、例えば、薬剤が関節炎の障害を有する危険性があると疑われる被験体を処置するために適切であるかどうかは、本明細書中の開示に基

づいて、そして本明細書中で提供されるいくつかの実施形態を参照して、当業者が過度の実験を行うことなく、容易に明らかである。従って、本明細書中に提供されるような、候補薬剤の存在下での変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベル（そして必要に応じて、本明細書中で提供されるような変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの共働指標のレベル）は、薬剤の非存在下での同じ指標（そして、必要に応じて、同じ共働指標）のレベルと比較して、関節炎の障害を有する危険性がないことが既知である被験体において見出されるものに近いレベルになるように統計学的に有意な経路で変化させられる場合、この薬剤が、関節炎の障害を有する危険性があると疑われる被験体を処置するために適切であることが明らかである。

【0141】

特定の関連する実施形態においては、本発明は、被験体への候補薬剤の投与の前および後で被験体から得られた生物学的サンプル中の変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較することによって（または、変化したミトコンドリア機能の共働指標のレベルと、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの異なる指標とを比較することによって）、関節炎の障害を有する危険性があると疑われる被験体を処置する薬剤の適性を決定する方法を提供する。特定の他の関連する実施形態においては、本発明は、それぞれの被験体への候補薬剤の投与の前および後で多数の被験体から得られた少なくとも1つの生物学的サンプル中の変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較することによって（または、変化したミトコンドリア機能の共働指標のレベルと変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの異なる指標とを比較することによって）、関節炎の障害を有する危険性があると疑われる脊椎動物被験体を処置する薬剤の適性を決定する方法を提供する。

【0142】

本明細書中の開示に基づいて、薬剤が適切であるかどうかの決定は、特定の診断、治療、臨床試験、研究および/または他の目的に依存し得、そしてこれは当業者の知見の範囲内である。従って、本明細書中で提供されるような、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを変更する（例えば、統計

学的に有意な様式で増大させるかまたは減少させる) 薬剤の同定は、このような薬剤が、関節炎の障害を処置するために、および/または関節炎の障害の発症を予防する、遅延させる、または遅らせるために、および/または関節炎の障害の重篤度を軽減するために使用され得るかどうかを示すために使用され得る。本明細書中で開示されるように、本発明は、一部、好気性のミトコンドリア呼吸が脊椎動物の関節の軟骨細胞において活性であり、そして変更された好気性の呼吸(例えば、ミトコンドリアの酸化的リン酸化)が関節炎の障害の病因に寄与するという、予想外の発見に関する。従って、本発明によって提供されるスクリーニングアッセイ(特定の好ましい実施形態においては、高スループットスクリーニングを含む)(これは、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標に対する候補薬剤の効果の決定を可能にする)が、このような指標のレベルを変更する薬剤を同定するために設計され得る。例えば、特定の被験体においてまたは特定の状況においては、適切な薬剤は、関節炎の障害において、症状を緩和し得、そして/または根底にある代謝の異常を逆転させ得る。特定の状況においては、例えば、ATPの合成を変更する(例えば、増大させるかまたは減少させる)薬剤が所望され得、そして適切な薬剤であり得る。他の状況においては、骨の質を調節する薬剤(例えば、骨の増殖を刺激することおよび/または骨の喪失を修復することによって)が、所望され得、そして適切な薬剤であり得る。以下に記載されるように、ミトコンドリア機能の1つ以上の指標における本発明の開示に従う変更(例えば、増大または減少)、および特に、ATPの生合成因子に関連するそのような指標における変更は、骨の質のような関節炎の障害についての1つ以上の生理学的パラメーターの有意性を調節し得る。

【0143】

なお他の特定の実施形態においては、本発明は、一部、例えば、関節炎の障害についての生物学的なモデル系(例えば、動物モデルまたは細胞株)を作製するための、脊椎動物被験体中の1つ以上の関節炎の障害を誘導する薬剤についてのスクリーニングアッセイに関連する。従って、本発明は、関節炎の障害の重篤度を誘導するかまたはそれに関係している薬剤を同定する方法を提供する。この方法は、被験体への候補薬剤の投与の前および後で被験体から得られた生物学的サ

ンプル中の変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを比較することによる（または、変化したミトコンドリア機能の共働指標のレベルと変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの異なる指標とを比較することによる。このような実施形態についての関連するバリエーションは、本発明の意図される範囲内であり、そして当業者によって明らかである。

【0144】

治療薬剤および/または誘導薬剤に関係する特に好ましい実施形態においては、薬剤は低分子である。本発明に従う変化したミトコンドリア機能の指標の調節因子をスクリーニングする方法における使用のための候補薬剤は、化合物、組成物、または分子の「ライブラリー」またはコレクションとして提供され得る。このような分子は、代表的には、「低分子」として当該分野で公知であり、そして 10^5 ダルトン未満の分子量、好ましくは 10^4 ダルトン未満の分子量、そしてなおより好ましくは 10^3 ダルトン未満の分子量を有している化合物を含む。例えば、試験化合物のライブラリーのメンバーは、サンプルの集団に対して投与され得、次いで、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを増大させるかまたは減少させるそれらの能力についてアッセイされ得る。

【0145】

候補薬剤はさらに、コンビナトリアルライブラリーのメンバーとして提供され得る。これは、好ましくは、多数の反応容器中で行われる多数の予め決定された化学反応に従って調製された合成の薬剤を含む。例えば、種々の出発化合物が、1つ以上の固相合成、記録されるランダムミックス方法論、および記録される反応のスプリット技術（これは、所定の構成要素が、多数の反応条件の順列および/または組合せを追跡可能に受けることを可能にする）を使用して調製され得る。得られる生成物は、スクリーニングされ、続いて、ペプチドの合成のコンビナトリアルライブラリー（例えば、第PCT/US91/08694号、第PCT/US91/04666号（これらはそれらの全体において本明細書中で参考として援用されている））、あるいは本明細書中で提供されるような低分子を含み得る他の組成物（例えば、PCT/US94/08542号、EP0774464号、U.S. 5,798,035号、U.S. 5,789,172号、U.S.

5, 751, 629号(これらは、それらの全体において本明細書中で参考として援用されている))のような反復的な選択および合成手順が行なわれ得るライブラリーを含む。当業者には、このようなライブラリーの種々の組合せが確立された手順に従って調製され得、そして本発明の開示に従って、変化したミトコンドリア機能の指標に対するそれらの影響について試験され得ることが、明らかである。

【0146】

本発明は、被験体または患者の集団の分類および/または層別化のための、薬理ゲノム学において有用である組成物および方法を提供する。例えば、1つの実施形態においては、このような層別化は、関節炎の障害と相関する変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標の1つ以上の異なるプロファイルの、被験体または患者の集団における同定によって達成され得る。このようなプロファイルは、関節炎の障害を発症する被験体の素因を示すパラメーターを規定し得、そしてさらに、関節炎の障害の新規なサブタイプの同定において有用であり得る。別の実施形態においては、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標と被験体中の1つ以上の形質との相関が、特定の治療処置に対する被験体の応答性、またはその効率を測定するために使用され得る。本発明の別の実施形態においては、被験体に由来する生物学的サンプル中の変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルの測定が、被験体中の関節炎の障害についての危険性またはその存在を決定するために、例えば、標準的なラジオグラフによって評価され得るように、被験体中の関節炎による軟骨の損傷の状態の同定と組合せられる。本明細書中で開示される変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを決定するための方法と、関節炎の障害の存在を決定するための当該分野で公知の方法との組合せを使用することによって(例えば、Primer on the Rheumatic Disease 第7版、J. H. Klippel (編)、1997 The Arthritis Foundation, Atlanta, GA)、関節炎の障害についての相対的な危険性を検出するための増強された能力が、他の関連する利点とともに本発明によって提供される。同様に、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベ

ルと関節炎の障害についての危険性が相関する場合には、本発明は、このような薬剤が生物学的な供給源中の変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルに影響を与える、関節炎の障害を処置するために適切な薬剤を同定するための有利な方法を提供する。

【0147】

本明細書中に記載されるように、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルの決定もまた、関節炎の患者の集団（すなわち、別々の基準によって関節炎の障害を有すると分類された集団）を層別化するために使用され得る。従って、本発明の別の好ましい実施形態においては、関節炎の被験体に由来する生物学的サンプル中の変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルの決定は、その被験体についての有用な相関する指標を提供し得る。変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルに基づいてそのように分類された関節炎の被験体は、上記に言及されるような関節炎の臨床的なパラメーターを使用してモニターされ得る。その結果、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルと関節炎の障害を評価するために使用される任意の特定の臨床的なスコアとの間での相関関係がモニターされ得る。例えば、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルに従う関節炎の患者の集団の層別化は、関節炎の被験体において使用される任意の候補の治療薬の有効性と相関する有用なマーカーを提供し得る。

【0148】

特定の他の実施形態においては、本発明は、コントロールの被験体または正常な被験体中に見出されるレベルにまで、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標を実質的に回復させる薬剤を患者に投与することによって、関節炎の障害を有している患者を処置する方法を提供する。1つの実施形態においては、変化したミトコンドリア機能の指標は、産生されるATPの量である。別の実施形態においては、変化したミトコンドリア機能の指標（または共働指標）は、存在するmtDNAの量である。最も好ましい実施形態においては、正常なレベルに対して変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標を実質的に回復させる（例えば、増大させるかまたは減少させる）薬剤は、コントロールの被験

体において見出されるレベルにまでその指標のレベルの回復を達成する薬剤である。別の好ましい実施形態においては、このような指標を実質的に回復させる薬剤は、被験体に対して臨床的に有用な効果を与える。別の実施形態においては、指標を実質的に回復させる薬剤は、変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標（または共働指標）のレベルにおいて統計学的に有意な変化を促進する。本明細書中に示されるように、当業者は、特定の指標のレベルにおける変化が、正常な値に近いレベルをもたらす、および/または被験体に臨床的な利点をもたらすかどうかを容易に決定し得る。従って、正常なレベルに対する変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標を実質的に回復する薬剤として、このようなレベルを完全にまたは部分的に回復し得る薬剤が挙げられ得る。

【0149】

従って、特定の好ましい実施形態においては、関節炎の障害を処置するために適切な薬学的組成物として、ミトコンドリア防御剤および/またはミトコンドリア機能変更剤が挙げられる。従って、ミトコンドリア防御剤は、関節炎の障害（例えば、変形性関節症（*osteoarthritis*）、変形性関節症（*degenerative joint disease*）など）を予防または処置するために、そして損傷した軟骨（例えば、外傷または反復的な運動障害によって損傷した軟骨）の治癒を促進するために、使用され得る。いかなる特定の理論にも束縛されることは望まないが、いくつかのこのようなミトコンドリア防御剤は、抗酸化剤としての活性を有し得、そしておそらく、ミトコンドリアに対する酸化ストレスによる損傷の影響を妨げるまたは緩和することによって作用し得る（概説については、Kowaltowskiら., *Free Radial Biol. Med.* 26: 463 - 471、1999を参照のこと）。他のこのようなミトコンドリア防御剤は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）を妨げるように作用する。アポトーシスは、変形性関節症の発症に寄与し得る（Blancoら、*Arthritis & Rheumatism*、41: 284 - 289、1998）。

【0150】

特定の実施形態においては、このようなミトコンドリア防御剤は、抗酸化化合

物であり得る。抗酸化化合物として、限定的ではないが例えば、以下が挙げられる：同時係属中の米国特許出願番号第09/237,999号および同第09/299,044号（それぞれ、米国代理人登録番号第660088.410号および同第660088.414）に記載される抗酸化化合物；Honokiol（Chiuら、Life Sci. 61:1961-1971、1997）、MagnololおよびProbucholのようなビフェニル化合物；Propofol；フラボノイド（例えば、ケンフェロール、クエルセチン、ミリセチン、クリシン、アピゲニン、ナリングニン、タキソホリン、カテキン（[2R,3S]-2-[3,4-ジヒドロキシフェニル]-3,4-ジヒドロ-1[2H]-ベンゾピラン-3,4,7-トリオール）、エピカテキン、およびアピゲニン）（概説については、例えば、Rice-Evansら、Free Radical Biology & Medicine 20:933-956、1996を参照のこと）； α -リポ酸；vutin水和物；没食子酸プロピル（3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸プロピルエステル）；Trolox（登録商標）；メタロポルフィリン（例えば、MnTBAP[Mn(III)テトラキス（4-安息香酸）ポルフィリンクロリド]およびMnTMPyP[Mn(III)テトラキス（1-メチル-4-ピリジル）ポリフィリンペンタクロリド]（Dayら、Free Radical Biology & Medicine 26:730-736、1999；Batinić-Heberleら、J. Biol. Chem. 273:24521-24528、1998；モリン（2',3,4',5,7-ペンタヒドロキシフラボン）；Resveratrol；ルチン；LNAC（N-アセチル-L-システイン））；セレン（salen）-マンガニ誘導体（例えば、米国特許第5,834,509号に記載されているもの）；非ステロイド抗炎症薬の抗酸化物エステル（NSAID）（例えば、米国特許第5,908,849号に記載されている）；L-エルゴチオネイン（PCT国際公開出願番号第WO98/36748号）；オルト-ヒドロキシピリジノン誘導体（PCT出願番号第WO99/23075号）；ジピリダモールおよびその誘導体（例えば、RA-14、RA-47、およびRA-25のような）（Nepomucenoら、Biochim. Biophys. Acta 1418:

285-294、1999; Nepomucenoら、Free Rad. Biol. Med. 23:1046-1054、1997); SR27338 (Herbertら、J. Lipid Mediat. 8:31-51、1993); イチョウ (Ginkgo bilboa) 抽出物、EGb 761 (Shenら、Biochem. Mol. Biol. Int. 35:125-134、1995); N-アセチルシステイン (Cossarizzaら、Exp. Cell. Res. 220:232-240、1995); プロパノロール (Freedmanら、Free Radic. Biol. Med. 11:197-206、1991); エブセレンおよびそのグルタチオン付加物 (Narayanawamiら、Biochem Pharmacol. 40:1623-1629、1990); ジヒドロキノリン (例えば、MTDQ-DA [Rathら、Basic Res. Cardiol. 82 (補遺2):335-345、1987]; Stobadine (Stolcら、Brain Res. Bull. 42:335-340、1997); グルタチオン (Cawthonら、Poult. Sci. 78:114-124、1999); Trinolein (Chanら、Pharmacology 52:216-225、1996); カルベジロール (Morenoら、Rev. Port. Cardiol. 17 (補遺2):1163-1177、1998); Tauroursodeoxycholate (Vendemialeら、J. Hepatol. 28:46-53、1998); メチオニン (これは、フリーラジカルスカベンジャーのレベルの増大を生じる) (Selvamら、Indian J. Biochem. Biophys. 29:364-370、1992); CoQ10および他のユビキノン (Kaganら、Free Rad. Biol. Med. 9:117-126、1990); 公開されたPCT特許出願番号第WO98/25905号に記載されている抗酸化剤; ビタミンC (L-アスコルビン酸; Jyonouchiら、Nutr. Cancer 28:115-124、1997) およびビタミンE (Uranora、Eur. J. Biochem. 245:64-70、1997; Hamら、Arch. Biochem. Biophys. 339:157-164、1997)、両方とも単独で、そして互いにおよび/またはセレン (Scholz

ら、Biochem. Mol. Biol. Int. 42:997-1006、1997; Combsら、Fed. Proc. 34:2090-2095、1975) またはチオールおよびコレステロール (Vatasseryら、Neurochem. Int. 26:527-535、1995) のような他の薬剤と組合せて; ならびに、それらの組合せ。抗酸化剤は、それを必要としている被験体に対して、その治療的な送達のために設計された徐放処方物 (例えば、米国特許第5,897,879号に記載されているもの) またはリソソーム処方物 (例えば、米国特許第5,747,026号に記載されているもの) を通じて送達され得る。

【0151】

このようなミトコンドリア保護薬剤はまた、アポトーシス (プログラムされた細胞死) をもたらす細胞経路において1以上の段階を阻害するように作用する化合物であり得る。このような抗アポトーシス化合物としては、例示のためであり限定するものではなく、カスパーゼ (caspase) として公知のアポトーシスプロテアーゼのインヒビター (検討のために、例えば、Thornberryら、Science 28:132~136、1998を参照) が挙げられこれは、そのインヒビターとして、Thornberry (Chem. Biol. 5:R97~R03、1998) およびGarcia-Calvoら (J. Biol. Chem. 273:32608~32613、1998) により記載されるような、オリゴペプチド誘導体; 米国特許第5,929,042号に記載されるような、アンチセンス化合物; 例えば、シクロスポリンAを含むシクロスポリンのような、ミトコンドリア透過性遷移のインヒビター; ボンレキック酸 (bongkreikic acid)、およびイソボンレキック酸 (isobongkreikic acid); および、同時係属中の米国特許出願番号09/237,999および同09/299,044 (代理人事件整理番号は、それぞれ660088.410および660088.414) に記載されるような、タブシガルジン保護化合物が挙げられる。

【0152】

従って、これら、および他の関連した実施形態において、本明細書中に提供さ

れたように、薬剤は関節炎障害の処置または予防のために、患者に投与され得る。好ましくは、この薬剤はミトコンドリア機能変化薬剤（本明細書中に提供されるように、ミトコンドリア保護薬剤を含み得る）であり、それは、変化したミトコンドリアの機能の少なくとも1つの指標を、コントロールまたは通常の被験体において見られるレベルに回復する。好ましくは、本発明の方法において使用される場合、このような薬剤は、薬学的組成物の一部である。この薬学的組成物は、1以上のミトコンドリア機能変化薬剤に加えて、薬学的に受容可能なキャリア、希釈液または賦形剤の少なくとも1つ、および、必要に応じて、他の成分を含む。

【0153】

本発明により同定されたミトコンドリア機能変化薬剤（本明細書中に提供されたように、ミトコンドリア保護薬剤を含む）、またはその薬学的に受容可能な塩は、治療に有効な量で患者に投与される。治療に有効な量は、所望の効果を達成するために計算された量である。投与経路が特定の処置に伴って変化し得ることは、当業者にとって明らかである。投与経路は非侵襲性または侵襲性のいずれかであり得る。非侵襲性投与経路として、口腔、頬/舌下、直腸、鼻腔、局所（経皮および眼を含む）、腔、膀胱内、および肺が挙げられる。侵襲性投与経路として、動脈内、静脈内、皮内、筋肉内、皮下、腹腔内、硬膜下腔内および眼内が挙げられる。

【0154】

必要とされる投与量は、特定の処置および投与経路に伴って変化し得る。一般的に、ミトコンドリア保護薬剤の用量は、1日当たり、ホスト動物の体重のキログラム当たり、その化合物約1～約5mgであり；頻繁には、それは約100μgと約5mgとの間であるが、1日当たり体重kg当たり、化合物最大約50mgまで変わり得る。治療投与は、一般的に医師の指導下で行われ、薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリア中にミトコンドリア保護薬剤を含む。これらキャリアは、当該分野では周知であり、代表的には、非毒性の塩および緩衝液を含む。このようなキャリアは、生理学的に緩衝化された生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水などの緩衝液、グルコース、マンノース、スクロース、マンニトール

またはデキストランなどの炭水化物、グリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート化剤、アジュバンド、および保存剤を含み得る。受容可能な非毒性の塩として、酸付加塩または、例えば、亜鉛、鉄、カルシウム、バリウム、マグネシウム、アルミニウムなどとの金属錯体（これらは、本出願の目的のための付加塩として考えられる）が挙げられる。このような酸付加塩の例として、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、タンニン酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、アルギン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩などが挙げられる。活性成分が、錠剤の形態で投与される場合、この錠剤は、トラガント、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤；アルギン酸などの崩壊剤；およびステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤を含み得る。液体形態での投与が所望される場合、甘味料および／または香料が使用され得、等張性生理食塩水、リン酸緩衝溶液などにおいて静脈内投与が行われ得る。

【0155】

本発明の1つの実施形態において、本発明の1以上の化合物を含む薬学的組成物はリポソーム内にトラップされる。リポソームは、二分子層立体配置に整列した脂質から構成された、1以上の外層に囲まれた水性コアを有する微視的球体である（例えば、Chonnら、Current Op. Biotech. 6:698、1995参照）。薬物送達薬剤としてのリポソームの治療効力は、ほぼ30年前に理解された（Sessaら、J. Lipid Res. 9:310、1968）。リポソームは「立体的に安定化したりポソーム（sterically stabilized liposome）」（本明細書中で使用される用語であり、リポソームに組み込まれた場合、1以上の特定化された脂質を含むリポソームをいう）を含み、その結果、このような特定化された脂質を欠くりポソームに対して循環寿命を高める。立体的に安定化されたりポソームの例は、リポソーム小胞体形成脂質の一部が、（A）モノシアロガングリオチド G_{M1} などの、1以上の糖脂質を含むか、または（B）ポリエチレングリコール（PEG）部分のような、1以上の親水性のポリマーで誘導体化され、立体的に安定化されたりポソームである。任意の特定の理論により、拘束されるべきではないが、当該

分野においては、少なくとも立体的に安定化されたリポソーム（ガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG誘導体化脂質を含む）に対し、これらの立体的に安定化したリポソームの循環半減期が高まること、細網内皮性システム（RES）の細胞内への取りこみの減少に由来すると考えられる（Allenら、FEBS Letters 223:42、1987；Wuら、Cancer Research 53:3765、1993）。

【0156】

1以上の糖脂質を含む種々のリポソームは、当該分野で公知である。Papa had jopoulosら（Ann. N. Y. Acad. Sci. 507:64、1987）は、モノシアロガングリオシド G_{M1} 、硫酸ガラクトセレブロシドおよびホスファチジルイノシトールの、リポソームの血中半減期を改善する能力を報告した。これらの知見は、Gabizonら（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:6949、1988）により説明された。米国特許第4,837,028号およびWO 88/04924（両者ともAllenら）は、（1）スフィンゴミエリン、および（2）ガングリオシド G_{M1} またはガラクトセレブロシドの硫酸エステルを含むリポソームを開示する。米国特許第5,543,152号（Webbら）は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示する。1,2-sn-ジミリストイルホスファチジルクロリンを含むリポソームは、WO 97/13499（Limら）に開示される。

【0157】

1以上の親水性ポリマーで誘導体化された脂質を含む種々のリポソーム、およびその調製法は、当該分野において公知である。Sunamotoら（Bull. Chem. Soc. Jpn. 53:2778、1980）は、非イオン性の界面活性剤、 $2C_{12}15G$ （PEG部分を含む）を含むリポソームを記載した。Illumら（FEBS Letters 167:79、1984）は、ポリマー性グリコールによるポリスチレンの粒子の親水性コーティングが、顕著に増加した血中半減期を生じることを示した。ポリアルキレングリコール（例えば、PEG）のカルボキシル基の結合により修飾した合成リン脂質が、Sears（米国特許第4,426,330号および同第4,534,899号）により記載さ

れる。Klibanovら (FEBS Letts. 268:235, 1990) は、PEGまたはステアリン酸PEGで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン (PE) を含むリポソームが血中循環半減期において顕著な増加を有することを実証する実験を記載した。Blumeら (Biochimica et Biophysica Acta 1029:91, 1990) は、このような知見をジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) およびPEGの組み合わせから形成された他のPEG誘導体化リン脂質 (例えば、DSPE-PEG) に拡大した。リポソームの外面に共有結合したPEG部分を有するリポソームは、欧州特許第0 445 131 B1号およびWO 90/04384 (Fisher) に記載される。PEGで誘導体化されたPEを1~20モルパーセント含むリポソーム組成物、およびその使用方法是、Woodleら (米国特許第5, 013, 556号および同第5, 356, 633号) およびMartinら (米国特許第5, 213, 804号および欧州特許第0 496 813 B1号) により記載される。多数の他の脂質ポリマー結合体を含むリポソームは、WO 91/05545および米国特許第5, 225, 212号 (両者ともMartinら) およびWO 94/20073 (Zalipskyら) に開示される。PEG修飾セラミド脂質を含むリポソームはWO 96/10391 (Choiら) に記載される。米国特許第5, 540, 935号 (Miyazakiら) および同第5, 556, 948号 (Tagawaら) は、それらの表面上の機能的な部分でさらに誘導体化され得るPEGを含むリポソームを記載する。

【0158】

本発明に従って、同定されたミトコンドリア機能変化薬剤は、本明細書中で提供されるようなミトコンドリア保護薬剤を含み、そのプロドラッグも含む。本明細書中で使用されるように、「プロドラッグ」は、任意の共有結合したキャリアであり、このようなプロドラッグが脊椎動物の被験体に投与されると、活性な親薬物をインビボに放出する。所定の化合物のプロドラッグは、慣用的な操作またはインビボのいずれかにおいて、修飾体は切断され、親化合物となるような様式で、その化合物に存在する官能基を修飾することにより調製される。プロドラッ

グとしては、以下の化合物が挙げられるが、これらに限定されない：ヒドロキシル基、アミノ基またはスルヒドリル基が、結合を介して親化合物のいずれかの基と結合し、プロドラッグが被験体に投与された場合に切断され、それぞれ、遊離ヒドロキシル基、アミノ基、またはスルヒドリル基を形成する化合物。プロドラッグの代表的な例としては、アルコールおよびアミン官能基の酢酸誘導体、フマル酸誘導体、および安息香酸誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0159】

治療用途のための「薬学的に受容可能なキャリア」は薬学的分野では周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Cennaro 編、1985) に記載される。例えば、無菌の生理食塩水および生理学的pHのリン酸緩衝化生理食塩水が使用され得る。保存剤、安定化剤、色素、および香味剤でさえ、薬学的組成物として提供され得る。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが、保存剤として添加され得る。さらに、酸化防止剤および懸濁剤が使用され得る。必要に応じて、特定の投与経路に対しては、麻酔薬が処方物に含まれ得る。

【0160】

「薬学的に受容可能な塩」とは、このような化合物および有機もしくは無機酸（酸付加塩）または有機もしくは無機塩基（塩基付加塩）の組み合わせから誘導体化された本発明の化合物の塩をいう。本発明の化合物は遊離塩基または塩の形態のいずれかにおいて使用され得、両形態は本発明の範囲内であると考えられる。

【0161】

1以上のミトコンドリア機能変化薬剤を含む薬学的組成物は、組成物が患者に投与され得る任意の形態であり得る。例えば、この組成物は、固体、液体、または気体（エアロゾール）の形態であり得る。代表的な投与経路として、経口、局所、非経口（例えば、舌下または頬）、舌下、直腸、膣、および鼻腔内が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、非経口との用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内、硬膜下腔内、海綿体内（intrac

avernous)、道内、尿道内注射または注入技術を含む。薬学的組成物は、それに含まれた活性成分が、その組成物の患者への投与においてバイオアベイラブルであることを可能にするように処方される。患者へ投与される組成物は、1以上の投薬単位形態を取り得、例えば、錠剤は1回投薬単位であり得、エアロゾル形態の本発明の1以上の化合物の容器は、複数の投薬単位を有し得る。

【0162】

経口投与の場合、賦形剤および/または結合剤が存在し得る。その例として、スクロース、カオリン、グリセリン、デンプンデキストラン、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースおよびエチルセルロースが挙げられる。着色剤および/または香味剤が存在し得る。コーティング殻が利用され得る。

【0163】

組成物は液体形態、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、エマルジョン、または懸濁物であり得る。この液体は、2つの例として、経口投与、または注射による送達のためであり得る。経口投与が意図される場合、好まれる組成物は、1以上のミトコンドリア機能変化剤に加えて、1以上の甘味剤、保存剤、染料/着色剤および香味増強剤を含む。組成物が、注射による投与を意図される場合、1以上の界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定化剤、および等張剤が含まれ得る。

【0164】

溶液形態、懸濁形態、または他の同様の形態のいずれの形態であっても、本明細書中で使用されるような液体の薬学的組成物は、以下の1以上のアジュバンドを含み得る：注射のための、水などの無菌希釈液、生理食塩水溶液、好ましくは生理学的生理食塩水、リンガー液、等張性塩化ナトリウム、合成モノまたはジグリセリドなどの不揮発性油（それは、溶媒または懸濁媒体として作用し得る）、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム塩などの抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸などのキレート化剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張力の調整のための薬剤。非経口製剤はアンブ

ル、ガラスもしくはプラスチックから構成される使い捨て可能なシリンジまたは複数投与バイアルに封入され得る。生理学的生理食塩水は、好ましいアジュバンドである。注射可能な薬学的組成物は、好ましくは無菌である。

【0165】

非経口または経口投与のいずれかを意図する液体組成物は、適切な投薬が得られるような量のミトコンドリア機能変化剤を含む必要がある。代表的に、この量は、ミトコンドリア機能変化薬剤が、組成物中に少なくとも0.01wt%である。経口投与が意図された場合、この量はその組成物の重量の0.1と約70%との間で変化され得る。好ましい経口組成物は、約4%～約50%のミトコンドリア機能変化薬剤を含む。好ましい組成物および製剤は、非経口投薬単位が、活性化合物の0.01重量%と1重量%との間を含むように調製される。

【0166】

この薬学的組成物は、局所投与に対して意図され得、このような場合においてキャリアは、溶液、エマルジョン、軟膏、またはゲル基材を適切に含み得る。例えば、その基材として、以下の1以上が挙げられ得る：ペトロラタム、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱油、水およびアルコールなどの希釈液、ならびに乳化剤および安定化剤。局所投与のため、薬学的組成物中に濃化剤が存在し得る。経皮投与が意図される場合、その組成物は、経皮パッチまたはイオン泳動デバイスを含み得る。局所処方物は、約0.1～約10%w/v（単位容量当たりの重量）のある濃度のミトコンドリア機能変化薬剤を含み得る。

【0167】

この組成物は、直腸投与に対して意図され得、この場合、例えば、直腸で溶解し、薬物を放出する坐剤の形態をとる。直腸投与のための組成物は、適切な非刺激性の賦形剤として油性の基材を含み得る。このような基材として、ラノリン、ココアバター、およびポリエチレングリコールが挙げられるが、限定されない。

【0168】

本発明の方法において、ミトコンドリア機能変化薬剤は、挿入、ビーズ（beaded）、定期放出处方物、パッチ、または迅速放出处方物の使用により投与され得る。ミトコンドリア機能変化薬剤の最適投薬量が以下に依存し得ることは、当

業者にとって明らかである：患者の体重および身体的状態；処置される身体的状態の重症度および寿命；活性成分の特定の形態、投与様式および使用される組成物。化学療法におけるミトコンドリア機能変化薬剤の使用は、別の化合物（例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、タンパク質またはリポソームであり、それは上記化合物の送達を補助する）に結合されるような薬剤を含み得ることが理解される。

【0169】

本発明のいくつかの治療および予防方法は、ミトコンドリア機能を実行する軟骨細胞の能力を改善するための軟骨細胞のインビトロ/エキソビボでの操作、次いで、このような処置が必要な動物への移植を包含する。軟骨細胞のミトコンドリア機能を改善する1つの方法は、以下の工程を包含する。軟骨細胞の内存性ミトコンドリアDNA (mtDNA) を消耗し、ローゼロ (ρ^0) 細胞を産生する工程、および続いて、このような ρ^0 細胞に関節炎障害を有していない、または関節炎障害の傾向にあることが公知である動物由来のミトコンドリアを導入する工程。従って、その結果物である細胞ハイブリッド、またはサイブリッドは、親軟骨細胞由来の核構成成分、および健常動物由来のミトコンドリア構成成分を有する。これらのサイブリッド軟骨細胞は、改善されたミトコンドリア機能を有し、結果として軟骨細胞媒介関節炎制限活性をより良好に実行することが、期待される。エキソビボで操作された軟骨細胞が同一の動物由来であり、その細胞に軟骨細胞が最終的に再導入される場合、本発明の方法は、宿主による移植片受容を増加し、臨床結果を改善するという、さらなる利点を提供し、このことは、宿主の免疫システムによる移植された細胞の免疫学的拒絶（例えば、移植片拒絶）に対する能力の減少に起因する。この非限定的な理論によると、移植された軟骨細胞が、動物中で、非常に多数生存、および/またはより長期に持続するため、この利点は最近開示された方法の効率を改善する。さらに、本アプローチはこのような処置において所望されない副作用（例えば、免疫反応に起因する副作用およびそれらの後遺症（例えば、免疫抑制剤））の可能性も減少する。これら本発明の方法は、特定の実例において遭遇したヒト関節軟骨細胞の低トランスフェクション効率 (Terkeltaub, J. Clin. Invest. 94:217

3, 1994)などの、他のエクソビボでの軟骨細胞の操作を包含する方法における制限も回避する。

【0170】

本明細書中で提供されるように、軟骨細胞は単離され、インビトロで有糸分裂で増殖され、変化したミトコンドリア機能の1以上の指標を変化(例えば、増加または減少する)するために改変され得る。例えば、例示として、このような軟骨細胞は、ミトコンドリア機能を変化する適切な薬剤で処理され得、ここでこの薬剤は、本明細書中に記載された方法に従って同定された任意の薬剤であり得、小分子; タンパク質またはペプチド; 導入遺伝子を含む核酸分子、リボザイム、プラスミド、組換え発現ベクターなどのベクター、アンチセンス核酸、または変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルを変化する任意の他の薬剤を含むが、これらに限定されない。このように改変された軟骨細胞は関節炎障害を患う被験体における損傷部分に直接投与され得、そこでは新しい軟骨の生合成が起こり得る。あるいは、培養された軟骨細胞は、適切な条件下、インビトロで新しい軟骨組織を合成し得、次いで、このような組織は、組織損傷部分に移植片として移植され得る。米国特許4, 846, 835号は、自己由来の軟骨細胞を三次元コラーゲンマトリックス上に接種し、次いで、関節軟骨傷害部分にインビボで挿入され、縫合された骨膜弁を用いて適切な位置に固定される工程を開示する。米国特許5, 041, 138号は、次の移植のために三次元生分解性マトリックス上に軟骨細胞を接種し、あるいは、インビトロで遊離軟骨細胞を増殖し、次いで損傷部位に直接投与されることによるインビトロでの軟骨構造の増加を開示する。

【0171】

本発明の特定の実施形態に従って、ポリペプチドの増殖因子は軟骨細胞に加えられ得、関節軟骨特異性プロテオグリカンおよび/またはコラーゲンの産生を高め、または刺激する(例えば、Luyten & Reddi, 1992, in Biological Regulation of the Chondrocytes, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, MI, pp. 227~236参照)。好ましい増殖因子として、形質転換増

殖因子ベータ (T G F β)、インスリン様増殖因子 (I G F)、血小板誘導体化増殖因子 (P D G F)、表皮増殖因子 (E G F)、酸性線維芽細胞増殖因子 (a F G F)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、肝細胞増殖因子 (H G F)、ケラチノサイト増殖因子 (K G F)、骨形態発生因子 (B M P) (例えば、B M P - 1、B M P - 2、B M P - 3、B M P - 4、B M P - 5、およびB M P - 6)、および骨形成タンパク (O P) (すなわち、O P - 1、O P - 2、およびO P - 3) が挙げられるが、限定されない。T G F β 、I G F、P D G F、E G F、a F G F、b F G F、H G F、およびK G Fの好ましい濃度範囲は、約1 ~ 100 ng / mlであり、より好ましくは、約5 ~ 約50 ng / mlであり、および最も好ましくは約10 ~ 約20 ng / mlである。B M PおよびO Pの好ましい濃度範囲は、約1から約500 ng / mlであり、より好ましくは、約50 ~ 約300 ng / ml、および最も好ましくは、約100から約200 ng / mlである。しかし、これら特定の増殖因子は、限定されない。軟骨特異性プロテオグリカンおよびコラーゲンの産生を刺激、または誘導することのできるポリペプチド増殖因子のいずれも、本明細書中で提供される本発明により有用であり得る。

【0172】

一旦、有糸分裂で拡大した軟骨細胞の集団が得られると、最初に親細胞が誘導体化された同一被験体 (自己移植)、または異なる被験体 (異種移植) のいずれかにその細胞は移植され得る。さらに、異種移植は同種の関連、または非関連の個体異質遺伝子型、または異種の個体 (異種移植) から得られた軟骨細胞を利用し得る。あるいは、異質遺伝子型、または異種移植のいずれかである確立された長期細胞株から、軟骨細胞が得られ得る。

【0173】

ローゼンおよびサイブリッド細胞を調製ならびに使用方法は、米国特許第5,840,493号および同第5,888,438号、公開されたP C T出願WO 95/26973、およびWO 98/17826、KingおよびAttardi (Science 246:500~503、1989)、Chomynら (Mol . Cell . Biol . 11:2236~2244、1991

)、Millerら(J. Neurochem. 67:1897~1907、1996)、Swerdlowら(Annals of Neurology 40:663~671、1996)、Cassarinoら(Biochim. Biophys. Acta 1362:77~86、1997)、Swerdlowら(Neurology 49:918~925、1997)、Sheehanら(J. Neurochem. 68:1221~1233、1997)およびSheehanら(J. Neurosci. 17:4612~4622、1997)に記載される。ローゼン細胞を比較的短い期間で、迅速に得る方法が、いくつかの局面で所望され得、同時係属中の米国特許出願第09/069,489号および同第09/301,517号に記載される。

【0174】

脊椎動物被験体からの生物学的サンプルにおいて、関節炎障害に対する危険性を同定するためのキット、関節炎障害の疾患の進行度を決定するためのキット、または関節炎障害のサブタイプに従い、脊椎動物種の被験体を階層化するためのキットは、代表的に、本明細書中で提供される変化したミトコンドリア機能の少なくとも1つの指標のレベルの決定を可能にする1以上の試薬を含み、さらに変化したミトコンドリア機能の指標を検出するために有効な補助試薬を含み得る。非限定的な例として、ミトコンドリアの酵素触媒能である変化したミトコンドリア機能の指標を検出するため、キットには1以上の周知の比色分析試薬、分光光度試薬、蛍光定量試薬、免疫定量試薬、マススペクトロメトリー試薬、または放射測定試薬が、測定される特定の活性に依存して、指標の検出を容易にする補助試薬と共に含まれ得る。別の非限定的な例として、サンプル中のATPの産生を検出するため、ルシフェラーゼおよびそのATP依存性酸化物質であるD-ルシフェリンがキット中に、本明細書中で提供されるような変化したミトコンドリアの機能の指標の検出を容易にする補助試薬、例えば、ミトコンドリアインヒビター、またはミトコンドリア保護試薬と共に(この使用は、有気呼吸と比較し、無気呼吸を介して産生されたATPの定量を可能にする)に存在し得る。

【0175】

他の非限定的な例として、変化したミトコンドリア機能の指標であり得る特定

のタンパク質を検出するため、キット中に提供された試薬は、代表的には、このようなタンパク質に対して特異的な抗体である。このようなキットは、本試薬の直接的または非直接的検出に対し、適切なリポーター基も含む（すなわち、そのリポーター基は本試薬に共有結合され得、またはプロテインA、プロテインG、イムノグロブリンまたはレクチンなどの、それ自身が試薬と結合することが可能な二次分子に結合され得る）。適切なリポーター基として、酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase））、基質、補因子、インヒビター、色素、放射性核種、発光基、蛍光発光基およびビオチンが挙げられるが、限定されない。このようなリポーター基は、当業者に公知の標準的な方法を使用して、サンプル成分への試薬の結合を直接的または間接的に検出するために使用され得る。

【0176】

従って、変化したミトコンドリア活性の指標（本明細書中で提供される酵素である）を検出するためのキットは、代表的に、適切な緩衝液または他の補助試薬と組み合わせて酵素基質を含み、それは特定の実施形態において、ミトコンドリア活性と関係する本明細書中に記載した組成物を含み得る。例えば、酵素活性はまた、上記酵素触媒活性アッセイを実施する前に、酵素特異的な抗体を用い、免疫沈降工程を実施することによって、特異的に検出され得る。補助試薬は、例えば、物質のミトコンドリア酵素媒介変化を検出するため、このようなキットにおいても提供され得る他の試薬を含み得、本明細書中で提供されたミトコンドリアインヒビター、および/またはミトコンドリア保護試薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

従って、他の実施形態において、本発明によるキットは、変化したミトコンドリア機能の指標を測定するための少なくとも1つの試薬、および少なくとも1つの補助試薬を含み得、ここで当業者は、本開示および当該分野の関連知識に基づいて、測定される変化したミトコンドリアの機能の特定の指標に依存するこのような目的に対し、何が適切な試薬かを容易に決定し得る。

【0178】

これらの利点および関連した利点は、当業者に理解される。以下の実施例は例示のために提供され、限定するものではない。

【0179】

(実施例)

(実施例 1)

(電子伝達複合体ⅡⅡのインヒビターは、軟骨細胞におけるコラーゲンおよびプロテオグリカンの合成を阻害する)

ミトコンドリア機能の阻害(特に、電子伝達系複合体ⅡⅡの阻害)が軟骨細胞によるコラーゲンおよびプロテオグリカン合成に影響するか否かを決定するため、以下の実験を実施した。

【0180】

基本的には、Terkeltaubら(Arthritis Rheum. 41:2152~2164、1998)により記載されるように、ヒト関節性軟骨の軟骨細胞を、関節性軟骨サンプルのコラゲナーゼ消化に続いて単層培養により得た。これら初代培養における出発物質は、接合部交換外科的手術中に切除され、または剖検において、通常接合部または関節炎接合部から得られたヒト関節軟骨であった。関節軟骨細胞は、10% ウシ胎児血清(FCS)、1% グルタミン、100U/ml ペニシリン、および50μg/ml ストレプトマイシン(特に示さない限り、すべてSigma、St. Louis, MOからの試薬)と共に高グルコース(DMEM 高グルコース、Life Technologies, Inc. Grand Island, NY)を含有するダルベッコの改変イーグル培地で増殖した。代表的には、本明細書中に記載した研究では、初代細胞のみを使用した。

【0181】

不死化したTC28(「T/C-28」として公知)若年性助骨軟骨細胞は、Dr. Mary Goldring(Harvard Medical School, Boston, MA)により提供された。この型の実験に用いられ得る別の不死化哺乳動物細胞株は、ウサギ(Oryctolagus cuniculus)細胞株HIG-82(American Type culture

Collection, Manssas, VAより寄託番号CRI-1832で入手可能)である。TC-28細胞株を、関節軟骨細胞について上記したように補充した低グルコース/Ham's F-12(1:1)(Life Technologies, Grand Island, NY)を含有するDMEM中で培養し、続いて、1:10の分割比で約90%集密度に達した後に継代培養した。いくつかの実験において、無機化表現型、および生理学的軟骨構築に近似する軟骨細胞の三次元立体配置を誘導するため、軟骨細胞をポリHEMA(ポリヒドロキシエチルメタクリル酸)上で培養した(Glowackiら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172:93~98、1983)。

【0182】

関節軟骨細胞およびTC28細胞は、状態3、状態3/4、および状態3(分離した)の条件下(例えば、Ernsterら、1981 J. Cell Biol. 91(3パート2):227s; Boverisら、1973 Biochem. J. 134:707; Boverisら、1976 Biochem. J. 156:435を参照のこと)、2つの細胞の調製物をクラーク電極(Rank Bros. Botolph Claydon, Cambridge, UK)を使用して酸素消費測定することにより比較すると、比較できるほどの呼吸性の性質を示した。関節軟骨細胞およびTC28細胞は、NOおよびO₂⁻供与体SIN-1(500 μM)またはNO供与体NOC-12(250 μM)のいずれかへの曝露の後に、顕著に阻害された呼吸率を示し、細胞内ATPレベルを抑制した。ミトコンドリアETC複合体IIIインヒビターであるアンチマイシンA、およびミトコンドリアATPシンターゼ(複合体V)インヒビターであるオリゴマイシンも呼吸率を阻害し、関節軟骨細胞およびTC28細胞中の細胞内ATPレベルを抑制した。

【0183】

非致死ではあるが、アンチマイシンAのミトコンドリア有効用量を以下のように測定した。段階的に濃度を高めたアンチマイシンA(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を、培養した関節軟骨細胞およびTC-28細胞に添加した。基本的に生産者の説明書に従い、蛍光発生性H332

58 (Calbiochem, La Jolla, CA)を組み込むことにより細胞増殖を測定し、基本的に生産者 (Sigma) の説明書に従い、トリパンブルー (trypan blue) 色素排除 (Medzhradskyら、Biochem. Med. 13: 164~177、1975) により細胞の生存度を評価した。

【0184】

当該分野で公知のルシフェラーゼに基くアッセイ (Linら、Anal. Biochem. 24: 531~540、1968) の改変により全細胞ATPレベルを測定した；あるいは、関連アッセイおよび改変を使用し得る (例えば、蛍光プレートリーダーを使用するアッセイ形式について、Turmanら、In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 32: 1~4、1996を参照)。要するに、 2×10^6 細胞を洗浄し、10mlリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中でペレット化した。その細胞ペレットをドライアイス/エタノール浴中で急速冷凍し、その後、0.25 μ lの0.2M HClを添加し、続いて、0.3mlの2mMグリシン (pH 9.0) を添加した。サンプルを100で5分間加熱し、ついで氷上に置いた。0~500 pmolの精製ATP (二ナトリウム塩) を使用し標準曲線を作成した。100 μ lの細胞抽出物、または精製ATP標準を等容積のATPアッセイ混合物 (MgSO₄、DTT、EDTA、ルシフェラーゼおよびルシフェリン (すべてSigma Bioluminescence Assay Kitからで、すべて1:25に希釈を含む)) に添加した。5秒間のインキュベーションおよび15秒間の組込み後、サンプルをTD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA) で読んだ。

【0185】

これらの研究の目的は、可能である場合に、生存率の10%を超える損失を起こさずに、全細胞ATPレベルを抑制するアンチマイシンAのレベルを見出すことだった。結果を、図1に示す。示された濃度のアンチマイシン (または、オリゴマイシン、次の実施例を参照) 存在下、5ml中の関節軟骨細胞またはTC28細胞 (5×10^5) を3通り研究し、24時間毎に全部で72時間投与し、上

記のように全細胞内ATP濃度を測定した。生存率測定結果を図1Bに示し、ここで示された濃度のアンチマイシン（または、オリゴマイシン）の存在下、0.2 ml中の 2×10^4 の軟骨細胞またはTC28細胞を、3通りで培養し、24時間毎に全部で72時間投与し、細胞生存度をトリパンブルー色素排除により定量した（ > 200 個の細胞がそれぞれの複製に対し、カウントされた）。供給者の説明書に従い、Promega（Madison、WI）乳酸脱水素酵素放出アッセイキットを使用して、基本的に同一の結果（示さない）を得た。

【0186】

これらの研究は、0.025 mMアンチマイシンAが、生存度の損失を10%より少なく、高い解糖レベルを恒常的に変化させることなしに、細胞内ATPレベルを50～80%まで消耗させることを示した。他に示さない限り、アンチマイシンAのこの選択された濃度を、さらなる全ての実験において使用した。

【0187】

トリチウム化したプロリン（ $[^3\text{H}]$ -プロリン）生合成タンパク質標識およびコラゲナーゼ感受性タンパク質産生を測定することにより、コラーゲン産生を測定した（図2）。関節軟骨細胞またはTC28細胞（ 5×10^5 細胞）を、示した薬剤の24時間毎の添加により、0.025 mMのアンチマイシンA（または0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のオリゴマイシン、次の実施例参照）を含むように作製した5 mlの培地でプレートした。ミトコンドリアインヒビターを添加した後、細胞をさらに48時間培養した。ついで、培地を除き、5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の $[^3\text{H}]$ -プロリン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルベート、および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の β -アミノプロピオニトリル（propionitrile）を含む無血清培地と取りかえ、さらに8時間インキュベーションを続けた。ついで、培地を収集し、15%トリクロロ酢酸（TCA）で沈殿した。細胞を1M NaCl、1mM N-エチルマレイミド、0.2 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、0.75 mM EDTAで抽出し、ついで15% TCAで沈殿した。その沈殿物を5% TCAで3回、および0.5% タンニン酸を含む5% TCAで1回洗浄した。そのペレットを溶解し、0.05 M トリス塩酸、pH 7.6、5 mM CaCl_2 、2.5 mM N-エチレンマレイミドに再懸濁した。80 unit /

mlのコラゲナーゼと共に2時間インキュベーションし、続いて10% TCA / 0.5%タンニン酸を添加し、そしてその上清をトリチウムチャンネル中の標準シンチレーションカウンティングのためのシンチレーション流体に添加することにより、全タンパク質1 μ g 当たりのコラゲナーゼ感受性タンパク質を測定した。

【0188】

[35 S]標識およびその同位体の取りこみにより、ならびに抽出し、続いてSephadex (登録商標) G-25 (Pharmacia, Piscataway, NJ)でのカラムクロマトグラフィーにより精製したプロテオグリカンへの同位体の生合成組込み(van Oschら、Matrix Biol. 17: 413~424、1998)によりプロテオグリカンの合成を測定した。(図3)。軟骨細胞またはTC28細胞(3×10^6)は、直径10-cmの組織培養皿中の30mlの培地中にプレートし、この培地をアンチマイシンA(または0.02 μ g/mlのオリゴマイシン)で24時間毎に72時間0.025 mMにした。培養48時間後、無血清培地中の各プレートに20 μ Ci/mlの[35 S]-硫酸ナトリウムを加えた。全部で72時間後、培地を収集し、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で1回洗浄し、ついで0.5M NaOHに擦り取り、4 で48時間混合した。培地および細胞抽出物を、4M グアニジン塩酸塩でSephadex (登録商標) (Pharmacia, Piscataway, NJ) G-25M PD-10カラムから溶離した。溶離した部分をシンチレーション流体に添加し、カウントした(図3中のn=9の反復実験; スチューデントt-検定により* = $P < 0.05$)。これらの実験の結果(図2および3)は、アンチマイシンA添加の72時間後、軟骨細胞においてコラーゲンおよびプロテオグリカンの両方の合成が約50%を超えるまで抑制されることを示した。

【0189】

(実施例2)

(電子伝達コンプレックスVのインヒビターは軟骨細胞中のコラーゲンおよびプロテオグリカン合成を阻害する)

ミトコンドリアの機能阻害が軟骨細胞によるコラーゲンおよびプロテオグリカ

ン合成に普遍的に影響を与えたことを、アンチマイシンAが特異的にもしくは直接的にこれらの機能を抑制するメカニズムと対比して確認する目的で、オリゴマイシンを用いて以下の実験を行った。オリゴマイシンはアンチマイシンA（コンプレックスⅡⅡⅡ）とは異なる標的（コンプレックスⅤ）において電子伝達系を阻害するように作用する。

【0190】

軟骨細胞を前記実施例と同様に調製および培養し、オリゴマイシン濃度を徐々に高めて処理した（別記のない限り、これらの実施例中の試薬はすべてSigma, St. Louis, MO由来のものである）。前述のアンチマイシンAに関する実施例中で確立した判断基準と同じ規準を満たす（すなわち、10%を超える生存性の喪失を引き起こさないで、総細胞ATPレベルを抑制する）オリゴマイシンレベルを測定するために、ミトコンドリアの機能および細胞の機能をアッセイした。図1で示すように、0.02 μ Mのオリゴマイシンによって細胞内ATPレベルが、10%未満の生存性喪失を伴い、および構成性の高レベルの解糖を変化させることなく、50～80%減少した。別段の指示がない限り、このオリゴマイシンの選択濃度（0.02 μ M）は、以下の全ての実験に用いた。

【0191】

オリゴマイシンのATPレベルおよび生存性への効果を測定したことに加えて、軟骨細胞によるコラーゲン生合成（図2）およびプロテオグリカン産生（図3）に対するオリゴマイシンの影響を、前述の実施例に記載された方法論に基き測定した。アンチマイシンAを用いて測定されたように、オリゴマイシンの非致死量により、ミトコンドリア機能のインヒビターを添加して72時間経過後、約50%を超える軟骨細胞でコラーゲンおよびプロテオグリカン両方の合成が抑制された。

【0192】

要するに非限定的な理論によると、実施例1および2で示された結果から、ミトコンドリアの機能の損傷が、いくつかの細胞外マトリックス構成要素の合成の減少の確認に寄与することが示唆され、そのミトコンドリアの機能の損傷は、老化した軟骨細胞中で起こると考えられる。そのようなマトリックス構成要素合成

レベルの減少は、OA、RA、DJDなどのような関節炎性障害の顕著な特徴である。

【0193】

(実施例3)

(電子伝達インヒビターはTGF β が軟骨細胞の機能を刺激する能力をブロックする)

トランスホーミング増殖因子 β (TGF β) は、その強力かつ広範な作用により特徴づけられ、他の多くの既知の増殖因子と区別して用いられ得る (総説に関しては、例えば以下を参照のこと: Clark et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 30: 293 - 298, 1998; Alevisopoulos et al., Bioessays 19: 581 - 591, 1997; Massagu, Annu. Rev. Biochem. 67: 753 - 791, 1998)。TGF β は関節軟骨の修復能、特に関節炎における修復能に重要な役割を果たしていると示唆される (Pujol et al., Ann. Endocrinol. 55: 109 - 120, 1994)。高濃度のTGF β が関節炎性関節の滑液に見られた (van Beuningen et al., Lab. Invest. 71: 279 - 290, 1994)。TGF β は、コラーゲン、フィブロネクチンおよびプロテオグリカンのような細胞外マトリックス構成要素の合成を刺激し (Robert et al., Kidney Intl. 41: 557 - 559, 1992)、そしてインビトロでプロテオグリカンの分解を抑制する。さらにTGF β は、軟骨細胞増殖因子の中で唯一、特に老人由来の軟骨細胞中においてPPi合成の顕著な増加を引き起こし得る (Rosen et al., Arthritis Rheum. 40: 1275 - 1281, 1997)。

【0194】

軟骨細胞 (初代培養および不死化細胞株TC-28) は、いくつかのサンプル中にTGF β (10 ng/ml) を0 ~ 72時間の期間を通じて存在させたことを除いては、前述の実施例と同様に調製および培養した。本明細書に記載された実験で使用したTGF β は、R & D Systemsから購入した (Minne

apollis, MN; TGF β はまた、例えばSigma, St. Louis, MOもしくはResearch Diagnostics, Inc., Flanders, NJのような他の供給源からも入手し得る)。簡潔に言うと、関節の軟骨細胞またはTC28細胞(5×10^5 細胞)を5mlの完全培地で培養し、そして10ng/mlのTGF β 、0.025mMのアンチマイシンA、または0.02 μ g/mlのオリゴマイシンで処理した。この細胞は37℃で48時間インキュベートし、最初の24時間経過後アンチマイシンおよびオリゴマイシンを補充した。これらの細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、ドライアイス中で凍結させ、そして実施例1の記載と同様に細胞内ATPのアッセイを行った。

【0195】

表1に示されるように、これらの結果から、TGF β 処理により軟骨細胞中の細胞内ATPが、処理して72時間後に評価した場合、約3倍増加することが示された。しかし、アンチマイシンA(0.025mM)またはオリゴマイシン(0.02 μ M)を付加的に存在させた場合、この効果はブロックされた。これらの結果から、健全なミトコンドリアの機能には、軟骨細胞に対してこのような効果を有するTGF β が必要であったことが示唆される。

【0196】

【表1】

条件	ATP(pmoles/ μ g DNA): 関節軟骨細胞	ATP(pmoles/ μ g DNA): TC28 細胞
バッファーコントロール	435.2 $\pm$ 4.2	393.8 $\pm$ 29.8
オリゴマイシン	221.2 $\pm$ 14.0*	198.6 $\pm$ 3.7*
TGF β	1,158 $\pm$ 6.9*	801.6 $\pm$ 4.9*
オリゴマイシン+TGF β	398.3 $\pm$ 3.6	369.6 $\pm$ 5.0
アンチマイシンA	93.73 $\pm$ 5.9*	69.78 $\pm$ 4.0*
アンチマイシンA+TGF β	456.6 $\pm$ 9.6	299.6 $\pm$ 2.0
* $P < 0.01$ (対コントロール) (スチューデントt検定)	表示値は(平均 $\pm$ SD)	

(実施例4)

(ミトコンドリア機能のインヒビターは無機ピロリン酸塩 (P P i) の産生および合成を阻害する)

軟骨細胞は、無機ピロリン酸塩 (P P i) を多量に合成する能力に関して比較的特有の存在である。 P P i は、変形性関節症におけるアパタイトおよびリン酸カルシウム二水和物 (C P P D) 両方の沈着を強く調節する。

【 0 1 9 7 】

鍵となる、軟骨細胞によって産生される P P i 産生細胞外酵素は、プラズマ細胞膜糖タンパク質 1 (P C - 1) である。 P C - 1 は 5 ' - ヌクレオチドホスホジエステラーゼ I (E C 3 . 1 . 4 . 1) であり、ヌクレオチドピロホスホヒドラーゼ (E C 3 . 6 . 1 . 9) でもある。 P C - 1 は本明細書では N T P P P H P C - 1 と言及する。 A T P は、 N T P P P H P C - 1 の基質である。つまり A T P は細胞の生化学的エネルギー源であることに加えて、 P P i の重要な供給源でもあり得る。 P P i 合成におけるミトコンドリア産生 A T P の役割を測定するために、以下の実験を行った。

【 0 1 9 8 】

当実施例に記載され、かつ図 4 に示される一連の実験により、 T G F β 非存在下での P P i 合成におけるミトコンドリアの機能を阻害する薬剤の効果を調査した。軟骨細胞 (初代培養および不死化細胞株 T C - 2 8) を前述の実施例と同様に調製、培養、およびオリゴマイシン処理 (図 4 A) 、またはアンチマイシン A 処理 (図 4 B) した。細胞外 P P i は T e r k e l t a u b らの方法 (A r t h r i t i s R h e u m . 4 1 : 2 1 5 2 - 2 1 6 4 , 1 9 9 8) に従い、放射能分析により測定し、細胞内 D N A に対して補正した。細胞内 P P i レベルを測定するために、洗浄した細胞を 6 5 ° C で 4 5 分間熱処理し、再び一度洗浄し、そして溶解バッファー (1 % T r i t o n X - 1 0 0 、 1 . 6 m M M g C l ₂ 、 0 . 2 M T r i s 、 p H 8 . 1) に可溶化した。この手順は基本的に L o t z らにより記載された手順 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 2 : 1 0 3 6 4 - 1 0 3 6 8 , 1 9 9 5) に従った。これらの研究結果は、これらのミトコンドリア機能のインヒビターが基礎 P P i 合成を減衰させたことを示す (図 4) 。

【0199】

TGF β が細胞内および細胞外PPiレベルを増加させる能力に影響を与えるミトコンドリア機能のインヒビター的能力を、別の一連の実験により調査した。前述の実施例に記載された方法で調製した、アンチマイシンA処理軟骨細胞(図4B)またはオリゴマイシン処理軟骨細胞(図4A)およびコントロール(未処理)細胞を、TGF β (10 ng/ml)存在下もしくは非存在下でインキュベートし、細胞外および細胞内PPiレベルを測定した。アンチマイシンAまたはオリゴマイシンのどちらかによるミトコンドリア機能の阻害は、TGF β が細胞外および細胞内PPiを増加させる能力を排除した(図4)。

【0200】

関連の実験で、オリゴマイシンまたはアンチマイシンAどちらかのPC-1トランスフェクタントによるPPi合成における効果を、単独でまたはTGF β と組み合わせて測定した(図4)。簡潔に述べると、リポフェクタミンプラス(商標)(Life Technologies, Grand Island, NY)を用いて35 mmの組織培養皿中の 5×10^5 個のTC28細胞に一過的なトランスフェクションを行った。空のプラスミドDNA(2 μ g)または野生型ヒトPC-1をコードするDNAを含むプラスミドpcDNA3.1(2 μ g)(Johnson et al., 1999 Arth. Rheum. 42:1986; Terkeltaub et al., 1994 Arthritis Rheum. 37:934-41)を、提供者の説明に従って、本DNAと「プラス」試薬との複合体を形成した後に、液体試薬に加え、次いで1%のFCSを含有するDMEM/F12培地において37℃で3時間細胞とともにインキュベートした。次いで細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、完全培養培地に戻してさらに72時間インキュベートした。またTGF β 誘導性NTPPH PC-1をコードするヌクレオチド配列を含有するアデノウィルス遺伝子構築物についても、PPiの合成レベルを増大させることが記載されおよび提示されている(Johnson et al., J. Bone Miner. Res. 14:883-892, 1999)。アデノウィルス遺伝子の移入については、TC28細胞とは異なりプラスミドDNAでは効果的にトランスフェクトし得

ない、関節の軟骨細胞を用いてJohnsonらのプロトコール(1999 Arth. Rheum. 42:1986)に従い行った。しかし、一過的トランスフェクトしたTC28細胞、もしくはこれらのアデノウィルスNTPPPH PC-1遺伝子構築物を含有するアデノウィルス性軟骨細胞形質転換体は、アンチマイシンAもしくはオリゴマイシン存在下で細胞内および細胞外PPiレベルが増大し得なかった(図4)。つまり、ミトコンドリアの機能、特に酸化的リン酸化が、軟骨細胞における細胞外マトリックス合成およびPPi合成に対して重要であるATPを提供するようである。

【0201】

(実施例5)

(ミトコンドリア機能のインヒビターはマトリックス小腔でのカルシウムの病理的な沈着を増加させる)

変形性関節症のような関節の障害において、マトリックス小腔(MV)はカルシウムの病理的な沈着を媒介する(Anderson, Rheum. Dis. Clin. North Am. 14:303-319, 1988; Doyle, J. Pathol. 136:199-216, 1982; Doherty, Hosp. Pract. Off. Ed. 29:93-104, 1994)。病理的なカルシウム沈着に関してのミトコンドリアの構成要素を、もしあるならばこれを測定するために、以下の実験を行った。

【0202】

小結節を形成した軟骨細胞をpolyHEMA(ポリヒドロキシエチルメタクリレート)で覆われた組織培養フラスコ(Nalg Nunc International Corp., Rochester, NY)で培養し、上記に従って測定した投薬量および反応速度を用いて、アンチマイシンAまたはオリゴマイシン処理した;コントロールサンプルは、これらミトコンドリア機能のインヒビターにさらさなかったことを除けば、同じ方法で処理した。マトリックス小腔は基本的に以前に記載された手順(Johnson et al., J. Bone Miner. Res. 14:883-892, 1999)に従い調製した。簡潔に言うと、培地を回収し、まず20,000×g、4で20分間遠心分離し

て細胞の破片をペレットにした。次いで、 $100,000 \times g$ で1時間遠心分離してMV画分を単離した。MVは0.4mlの溶解バッファー(1.6mM $MgCl_2$ 含有0.2M Tris塩基、pH 8.1中に1% Triton X-100)に再懸濁した。

【0203】

MVのカルシウム沈着を媒介する能力を、基本的に以前に記載された手順(Johnson et al., J. Bone Miner. Res. 14:883-892, 1999)に従いアッセイした。MV画分(0.025ml中に約0.04mgのタンパク質)を0.5mlの石灰化培地(calcifying medium)(2.2mM $CaCl_2$ [$1 \mu Ci/ml$ の ^{45}Ca 含有]、1.6mM KH_2PO_4 、1mM ATP二ナトリウム塩、1mM $MgCl_2$ 、85mM NaCl、15mM KCl、10mM $NaHCO_3$ 、50mM N-Tris(ヒドロキシメチル)メチル2-アミノエタンスルホン酸、pH 7.6)に加え、ボルテックスし、そして37℃で24時間インキュベートした。次いで本サンプルを $14,000 \times g$ 、4℃で10分間遠心分離した。本ペレットをATPを含有しないコールド(放射性標識されていない)石灰化培地で2度洗浄した。本無機物画分の ^{45}Ca をHClに溶解し、5mlのシンチレーション液中で数えた。アッセイコントロールは、石灰化培地からのATP除去および/またはMVの熱不活性化(60℃、30分間)を含んだ。

【0204】

これらの実験の結果(図5)から、ATP処理した軟骨細胞由来のMVは、アンチマイシンAまたはオリゴマイシン処理した細胞から調製した場合、コントロール(未処理)細胞由来のものと比べて50%より多く ^{45}Ca ($p < 0.01$)を沈殿させることが証明された。コントロールの実験により、オリゴマイシン処理またはアンチマイシンA処理のどちらも、細胞関連NTPase活性を抑制せず、そしてどちらの薬剤もPPi分解アルカリホスファターゼ活性を変化させないことが示された(データでは示していない)。これらの結果から、酸化的リン酸化を含むミトコンドリアの機能は、マトリックス小腔の組成および鉱化(mineralizing)活性を調節することが示された。

【0205】

(実施例6)

(ミトコンドリアストレスの誘導後の軟骨細胞を防御する薬剤のスクリーニングアッセイ)

本実施例では、明らかになった軟骨細胞の機能を利用した、エネルギーの枯渇または反応性フリーラジカルのようなミトコンドリアのストレッサーから軟骨細胞を防御する薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイについて記載する。軟骨細胞TC28細胞は、10% FCS、1% L-グルタミン、100 U/ml ペニシリンおよび50 mg/ml ストレプトマイシン(Omega Scientific, Tarzana, CA) 補充DMEM/Ham's F12 培地(1:1)中での単層培養により、37℃、5% CO₂の条件下で維持した。GAG遊離のモニタリング(図10)のために、インビボでの軟骨細胞の生理的な非接着状態により近く類似させる目的で、インビトロ培養システムを用いてTC28細胞を、95%エタノール中の10%(w/v)溶液として供された細胞接着インヒビター、ポリ-2-ヒドロキシメタクリレート(polyHEMA)で、あらかじめ22℃、18時間でコーティングし、次いでPBSで2度洗浄した6ウェルのプレートに移した。完全培地(上記同様に補充したDMEM/F12)を次いでウェルに加え、そして細胞をこれらの条件下で72時間まで維持した(Folkman et al., 1978 Nature 273:345; Reginato et al., 1994 Arthritis Rheum. 37:1338)。軟骨細胞の表現型の維持は、軟骨細胞の細胞外マトリックス構成要素であるII型コラーゲンおよびアグリカンをコードする遺伝子転写物のRT-PCR測定により確認した(Reginato et al., 1994)。

【0206】

軟骨細胞防御性薬剤候補(表2に列挙された)の非存在または存在下で、細胞を、ストレッサーとして培養液中加入たいくつかのアゴニストのうちのひとつに72時間さらした。非限定的な理論によると、そのようなストレッサーはひとつ以上のミトコンドリアのインヒビターとして、変化したミトコンドリア機能の

誘導物質として、アポトーシス誘導因子 (apoptogen) として、エネルギー枯渇薬剤などとして作用し得る。本実施例で使用したストレッサーは硝酸供与体 NOC - 12 (N - エチル - 2 - (1 - エチル - 2 - ヒドロキシ - 2 - ニトロソヒドラジノ) エタンアミン; Calbiochem, La Jolla, CA)、ペルオキシ亜硝酸塩 (peroxynitrite) 供与体 SIN - 1 (3 - モルホリノシドノンイミン (morpholinosydnonimine), HCl; Calbiochem)、および炎症性サイトカインヒト組換えインターロイキン1ベータ (IL - 1 β , Calbiochem) を含んだ。細胞傷害性は、前述のおよび製造者の説明に従い乳酸脱水素酵素遊離アッセイ (Promega, Madison, WI) を用いて測定し、そして軟骨細胞細胞内 ATP は実施例 1 に前述されているルシフェラーゼアッセイを用いて測定した。

【0207】

【表2】

表2 軟骨細胞防御化合物候補

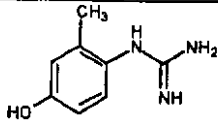
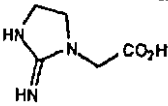
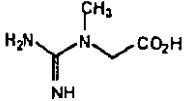
化合物	構造	合成の参考文献 (化合物 #)
A		WO 99/55321 # 30
B		WO 99/55321
C		WO 99/55321

表27772

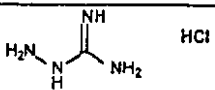
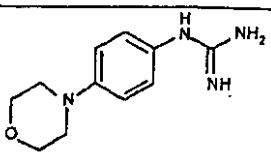
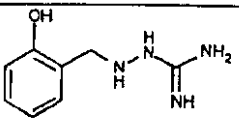
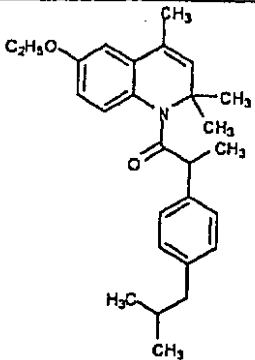
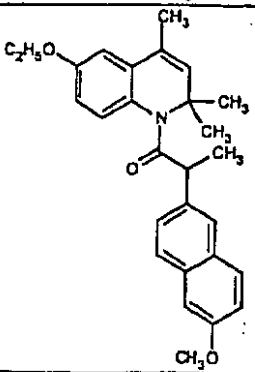
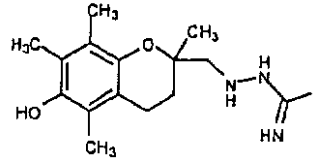
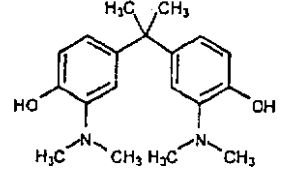
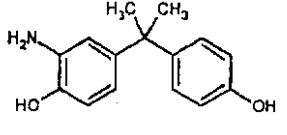
化合物	構造	合成のための参考文献 (化合物#)
D	 HCl	WO 99/55321
E		WO 99/55321 # 27
F		WO 99/55321 # 26
G		WO 99/37294 (#III-8)
H		WO 99/37294 (#III-7)

表2つづき

化合物	構造	合成のための参考文献 (化合物 #)
J		WO 99/37294 (#IV-9)
K		WO 99/37294 (#II-6)
L		WO 99/37294 (#II-9)

グリコサミノグリカン (GAG) の遊離は一般に、変形性関節症の病原論において主要な事象であると考えられている。そしてそれは IL - 1 β により刺激を受ける (例えば、Sztrolovics et al., 1999 Biochem. J. 339: 571 およびそこで引用された参考文献を参照)。ゆえに、GAG の遊離は、以下のように polyHEMA コーティングプレートで維持された軟骨細胞上で測定した: 本 polyHEMA 培養物に由来する軟骨細胞の軟骨「小結節」を、パパイン (20 mM リン酸ナトリウム pH 6.8、1 mM EDTA、2 mM ジチオトレイトール溶液中に 300 μ g/ml) で 1 時間消化した。遊離した GAG を、確立した手順 (Farndale et al., 1986 Biochim. Biophys. Acta 883: 173; Sztrolovics et al., 1999 Biochem. J. 339: 571) に従って、ジメチレンブルー (DMB) 色素結合により比色定量的にアッセイした。簡単に言うと、等分した本パパイン消化物を、46 μ M DMB、40 mM グリシン (pH 3.0)、40 mM NaCl を含む色素溶液に加え、そして直ちに分光光度計で 525 nm で読んだ。本サンプル中の GAG の

定量は、 $1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコンドロイチン硫酸のサンプルより作成した標準曲線を用いての計算により成し得た。誘導体化クレアチン、エトキシキン、およびグアニジン化合物を基にしたミトコンドリア防御薬剤は、基本的にWO99/37294 (PCT/US99/01718) およびWO99/55321 (PCT/US99/09990) (それらの全体が本明細書中に参考として援用される) で開示されているように合成した。これらの薬剤は、代表的な軟骨細胞防御薬剤候補としてテストした。

【0208】

図6は、 $100 \mu\text{M}$ のNOおよび O_2 供与体SIN-1にさらしたTC28軟骨細胞で、化合物A、BまたはC (それぞれ $1 \mu\text{M}$) により付与された、(LDH遊離による) 細胞生存性に対する防御効果を示している。同様の結果 (すなわち、NO細胞傷害性における本テスト化合物の緩和効果について) を図7に示している。ここではTC28細胞を、NO供与体NOC-12 ($250 \mu\text{M}$) のみ、または $1 \mu\text{M}$ の化合物A、B、またはC存在下でさらした。図8および9はそれぞれ、NO供与体NOC-12のみで、または $1 \mu\text{M}$ の化合物DまたはEの存在下で培養したTC28細胞の細胞内ATPレベルおよび細胞生存性を示している。図8において、細胞内ATPレベルは、NOC-12にさらさなかった対応のコントロール培養物と比較して示される。そして、NOC-12処理群はそれぞれ、防御化合物候補の存在または非存在に関わらず、細胞内ATPの顕著な抑制を示した。しかし、図9は細胞内ATP濃度の減少にもかかわらず、有意により高い生存性により、防御化合物のどれかひとつの存在下で維持した細胞が特色づけられたことを示す。同等の濃度 (それぞれ $1 \mu\text{M}$) において、化合物J、K、およびLはまた、SIN-1またはNOC-12にさらした細胞の細胞生存性測定において、軟骨細胞防御活性を示した。

【0209】

図10は、polyHEMAコーティングプレートで小結節として培養したTC28細胞でのIL-1 β 刺激によるGAG遊離の定量を示している。図10でも示されるように、化合物Cを含有させることで、GAG遊離の減少をいくらか弱めた。SIN-1 ($100 \mu\text{M}$) またはNOC-12 ($25 \mu\text{M}$) にさらした

TC28小結節もまたGAGを遊離し、そして本遊離の重度は、 $1\mu\text{M}$ の化合物Cを存在させた場合に弱まった（ここでは示されていない）。IL- 1β は細胞内ATPレベルの減少も、TC28細胞生存性の減少も引き起こさなかった。

【0210】

（実施例7）

（自己軟骨細胞移植（ACI））

大部分の組織とは異なり、関節の軟骨は、制限された治癒能力を有する；すなわち、一旦損傷すると、関節の軟骨はそれ自体正常には再生しない。軟骨損傷を有するいくらかの患者は、それらの症状を軽減するために関節鏡外科手術を受ける。このような外科手術手順には、損傷された領域の表面を滑らかにする手順（例えば、挫滅組織切除および洗浄）ならびに線維組織または癒痕組織を作り出す多くの技術（マイクロフラクチャー、穿孔、表皮剥脱関節形成）が挙げられる。癒痕組織が関節表面を覆うが、正常な関節（ヒアリン）軟骨よりも耐久性でも弾性でもない。

【0211】

このような外科手術手順の利点は、特に患者の先に損傷した活性レベルが維持される場合、長い間に減少する。症状は、しばしば再発し、患者は、疼痛とともに生きるか、別の外科手術手順を受けるか、または重篤な場合、人工的な（例えば膝の）プロテーゼでの関節全体の置換を受けるという選択に直面する。約200,000の膝全体の置換操作は、膝全体の置換について約25,000ドル～30,000ドルの費用で、毎年米国において行われている。その費用に加えて、人工関節の別の不利な点は、一般的に10～15年のみ続き、50代の人々には少ない処置の選択と考えられる点である。

【0212】

既存の処置の選択の乏しい長期の臨床的結果は、関節炎、変性骨障害および物理的外傷によって引き起こされる関節の損傷についての代替の処置を発見および開発するように研究者を刺激している。この実施例に詳細に記載されるように、本発明は、このような代替の処置を提供する。

【0213】

(A. 背景)

移植された細胞が細胞外マトリクス成分の産生および堆積を促進することによって損傷の修復を容易にすることを期待して、冒された部位に軟骨細胞を移植することによって、損傷した軟骨に苦しむ患者を処置する努力が行われている。このような努力において、軟骨細胞は、生物学的供給源から得られ、軟骨細胞は、有糸分裂的に増殖されて細胞集団を生成し、次いでこれは処置の必要な被験体の損傷した関節に外科手術的に移植される。外科手術移植は、「合成軟骨」(すなわち、内因的に産生され、分泌される細胞外マトリクス内に分散される軟骨芽細胞および/または軟骨細胞を含む組成物または製品)から形成される「軟骨パッチ」の形態であり得る。細胞外マトリクスは、代表的に、コラーゲン原線維(主に、ⅠⅠ型の原線維)および硫酸化プロテオグリカン(例えば、コンドロイチン-6-スルフェートおよびケラタンスルフェート)を含む。

【0214】

このような手順において、軟骨パッチにおける軟骨芽細胞および/または軟骨細胞は、それらが最終的に(再)移植(自己移植)される同じ被験体であり得るか、または異なる被験体(異種移植)であり得る生物学的供給源由来である。さらに、異種移植は、同じ種の関連するかまたは関連しない個体から(同種異系)か、あるいは異なる種(異種)から得られる軟骨細胞を利用し得る。あるいは、軟骨細胞が誘導される供給源は、同種異系または異種のいずれかである樹立された長期の細胞株であり得る。

【0215】

自己軟骨細胞移植(ACI)は、関節(しばしば膝を含む)損傷を受けた患者を処置するように設計され外科手術手順である(総説について、Gilbert, Am. J. Knee Surg 11:42-46, 1998を参照のこと)。既存の処置選択の乏しい長期の臨床的結果は、代替の処置としてACIの使用を開発するために1980年代初期の間、ニューヨークのHospital for Joint Diseaseにおける研究者を刺激した。さらなる開発は、University of GoteborgおよびSahlgrenska University Hospital, Goteborg, Sweden

nにおいて続けられた。7年の試験的な研究において、スウェーデンのグループの研究者は、少なくとも二年早く処置された膝の大腿骨部分の軟骨欠損を有する16人の患者のうちの14人において「良好～優秀の結果」を報告した。研究者は、膝の大腿骨部分で処置された患者の大部分が、欠損の代わりに正常な軟骨に類似したヒアリン様軟骨を発達させたことを記述した (Brittbergら, New England Journal of Medicine 331: 889 - 895, 1994)。

【0216】

Carticel (登録商標) (移植のための培養された自己軟骨細胞) は、Genzyme Tissue Repair (Cambridge, MA) によって米国および欧州において市販される。これは、急性または反復性外傷によって引き起こされる大腿顆 (femoral condyle) (内側、側面または滑車 (trochlear)) の臨床的に有意な症候性の欠損の修復における使用のために患者自身 (自己) の軟骨細胞を培養する商業的プロセスを使用する。1998年3月31日現在で、2,238の外科医が、この手順の訓練を受けており、Genzyme Tissue Repairが1995年に製品を市販し始めてから、合計で1,271人の患者が、処置されている。Carticel (登録商標) は、急性または反復性外傷によって引き起こされる大腿顆 (内側、側面または滑車) の臨床的に有意な症候性の軟骨の欠損の修復について示されている。

【0217】

Carticel (登録商標) を用いた処置は、整形外科医が、関節鏡外科手術手順において除去された患者の健康な関節軟骨の小さなサンプルをGenzyme Tissue Repairに提供するときに始まる。Cambridge, MAにおいて会社の細胞プロセッシング施設において技術者が、その患者に対して特別に数百万の新規な軟骨細胞を増殖させるための独占された方法を使用する。次いで、細胞をその病院に送達し、ここで外科医がそれらを介在的な外科手術手順で欠損に移植する。

【0218】

外科手術の間、医師は、注意深く損傷した組織を除き、そして培養された細胞の導入のために欠損を調製する。骨を覆う小片の膜組織（骨膜）を患者の下腿から取り、適所に細胞を保持するために欠損の上に縫合する。次いで、培養された細胞を欠損のこの組織の下に移植し、ここで、これらは、耐久性の新たな軟骨を作製するために周りの組織とさらに重ねられ、一体化される。

【0219】

1999年2月において、1995年における米国での導入以来のCarticel（登録商標）を用いて処置された患者についての結果を追跡および測定するGenzyme Tissue Repair's Registryからの結果が報告された。このデータは、Carticel（登録商標）のポジティブに安全なプロフィールを示し、そしてすべての4つの測定（膝状態の臨床医による評価、膝状態の患者による評価、膝試験からの臨床医の報告、および症状の患者の報告）における処置の24カ月および36カ月後での患者の高度に統計的に有意な改善を示した。

【0220】

臨床医の評価は、大腿顆欠損を有する患者の85%が、36か月の後に改善された一方、8%のみが減少した評価の評点を有したことを示した。患者の評価は、大腿顆欠損の85%が改善された一方、7%のみが減少した評価の評点を有したことを示した。

【0221】

登録所からのデータは、1987年以来成功してACIを使用していたスウェーデンの整形外科医の経験と一致する。1997年2月における毎年の整形学会におけるこれらの外科医によって提示された新たなデータは、Brittbergら（1994）に示される長期の利点を確認した。外科医は、2～9年後に処置された92人の患者について報告した。88%の全体の改善率は、大腿骨（thigh-bone、femur）の損傷について処置された全ての患者について報告した。さらに顕著なことに、これらは、大腿骨の重さ支持領域にある単一の単離された欠損について処置された患者（それ以外は安定な膝を有する）において96%の改善率を報告した。

【0222】

Carticel (登録商標) は現在、1997年8月に発行された米国食品医薬品庁からのBiologics License下で市販される。FDAは、Carticel (登録商標) に「急性または反復性外傷によって引き起こされる大腿顆 (内側、側面または滑車) の臨床的に有意な症候性の軟骨の欠損の修復」について許可を与えた。

【0223】

ACIにおいて使用される軟骨細胞のエキソビボ操作がそれらの治療的可能性を改善するために使用され得ることが期待される。例えば、患者への移植のためにとっておかれた軟骨細胞は、エキソビボで操作されてマトリクス成分を産生する際により熟練 (proficient) され得、得られた移植物は、より迅速および/または広範な治癒を提供することが期待される。特定の実施形態において、本発明の方法は、いくつかの形態のDNAを用いてヒト関節軟骨細胞を非効率的にトランスフェクションすることから生じる軟骨細胞を操作するエキソビボ方法の限界を迂回する。

【0224】

(B. 代表的手順)

(1. 組織含有軟骨形成細胞の単離)

本発明の実行に有用な軟骨形成細胞は、例えば、前から存在する軟骨組織、軟骨膜組織または骨髄のような細胞を含む哺乳動物における種々の供給源からサンプリングされ得る。肋軟骨、鼻軟骨、耳介軟骨、気管軟骨、喉頭蓋軟骨、甲状軟骨、披裂軟骨および輪状軟骨が軟骨形成細胞の有用な供給源であるが、関節軟骨 (体重支持または非体重支持関節のいずれか由来) は、好ましい供給源である。関節軟骨の生検サンプルは、関節鏡外科手術または介在的関節手術を実行する外科医によって容易に単離され得る。生検組織を単離するための手順は、当該分野において周知である; 例えば、McGintyらによる、「Operative Arthroscopy」(1991)、Raven Press、New Yorkを参照のこと (この開示は、本明細書中において参考として援用される)。

【0225】

軟骨膜組織は、関節軟骨を除く全ての型の軟骨の表面をコーティングする膜組織である。軟骨膜組織は、下にある血管新生化されていない軟骨組織にある軟骨細胞に栄養を提供する。骨粗しょう症に苦しむ患者の肋軟骨（肋骨軟骨）からサンプリングされた軟骨膜組織は、正常な関節軟骨が疾患されるかまたは利用可能でない場合、軟骨形成細胞の供給源を提供する。軟骨膜組織の生検サンプルは、肋軟骨の表面からか、または、関節軟骨、鼻軟骨および輪状軟骨の表面から当該分野で周知の単純な外科手術手順を使用して単離され得る（例えば、Skogら, Scan. J. Plast. Reconstr. Hand Surg. 24: 89-93, 1990; Bulstraら, J. Ortho. Res. 8: 328-335, 1990; および Hommingaら, J. Bone Constr. Surg. 72: 1003-1007, 1990を参照のこと）。

【0226】

本発明の実行に有用な軟骨形成細胞（特に間葉細胞）が骨髓から単離され得ることが意図される。骨髓の単離に有用な外科手術手順は、当該分野で周知である（例えば、Wakitaniら, J. Bone Joint Surg. 76: 579-591, 1994を参照のこと）。

【0227】

（2．露出された軟骨形成細胞の調製）

軟骨組織、軟骨膜組織、および骨髓から露出された軟骨形成細胞を調製するためのプロトコルが以下に記載される。

【0228】

（a）関節組織から

関節組織（荷重された（重量支持）と荷重されない（非重量支持）の両方）は、組織から脱凝集させ、そして細胞外マトリクスから露出された軟骨形成細胞を離すために、酵素処置に供され得る。タンパク質分解酵素（例えば、コンドロイチナーゼABC、ヒアルロニダーゼ、プロナーゼ、コラーゲナーゼまたはトリプシン）を含む溶液は、細胞外マトリクスを消化するために関節軟骨組織に加えられ得る（Watt & Dudhia, Differentiation 3

8 : 1 4 0 - 1 4 7 , 1 9 8 8)。

【0229】

好ましい手順において、関節軟骨は、最初に約1mm以下の直径の小片に切断される。これは、滅菌小刀を使用して慣用的に実行される。次いで、細かく切られた組織は、例えば、0.1%のコラーゲナーゼを含む溶液の添加によって酵素的に脱凝集される。0.25ml当量の細かく切られた組織について約1mlのコラーゲナーゼを加えた。次いで、サンプルを混合し、そして攪拌しながら37度で一晩(16時間まで)インキュベートする。一晩の消化に続いて、残りの小片の組織を遠心分離によって収集し、上清を除去し、そして得られた軟骨小片を、例えば、0.25%のコラーゲナーゼおよび0.05%のトリプシン(例えば、Sigma Chemical Co. St. Louisから入手可能)を含む溶液の添加によって再び消化する。残りの組織の0.25ml当量当たり約1mlの0.25%コラーゲナーゼ、0.05%トリプシンを加える。次いで、サンプルを混合し、そして攪拌しながら37度で2~4時間インキュベートする。任意の残りの組織を遠心分離によってペレット化し、そして細胞懸濁液を集めた。コラーゲナーゼトリプシン工程は、2~4回または組織が完全に脱凝集するまで繰り返される。

【0230】

酵素反応は、約10%のウシ胎仔血清(FBS)(Hyclone、Logan、Utahから入手可能)を補充された組織培養培地の添加によって終わる。好ましい細胞培養培地には、例えば、10%FBSを補充されたDulbecco最小必須培地(DMEM)(Sigma)が挙げられる。代替の細胞培養培地は、10%FBSを補充された、1:1(容積/容積)混合物のMedium 199(Sigma)およびMolecular Cell Developmental Biology Medium 202(MCDB 202)(Sigma)をそれぞれ含む。あるいは、本発明の実行に有用な別の細胞培養培地には、10%FBSを補充された、3:1(容積/容積)混合物のDMEMおよびHam's F-12(F12)(Sigma)をそれぞれ含む。

【0231】

露出された軟骨形成細胞を含む画分は、合わせられ、そして細胞は、細胞増殖および試験のために、約 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、より好ましくは、約 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、そして最も好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim 10^4$ 細胞 / cm^2 のプレーティング密度で細胞培養ディッシュに播種された。軟骨細胞は、上記手順を使用して、肋軟骨、鼻軟骨、耳介軟骨、気管軟骨、喉頭蓋軟骨、甲状軟骨、披裂軟骨および輪状軟骨から単離され得る。

【0232】

(b) 軟骨膜形成組織から

露出された軟骨形成細胞は、好ましくは、本明細書中上記のセクション1(a)に記載される手順と同じ手順を使用して軟骨膜組織から単離される。手短には、組織は、約1mm以下の直径の小片に細かく切られる。細かく切られた組織は、タンパク質分解酵素（例えば、トリプシンおよびコラーゲナーゼ）を用いて繰り返し消化される。得られた露出された細胞は、細胞増殖および試験のために、約 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、好ましくは、約 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、そして最も好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 細胞 / cm^2 のプレーティング密度で細胞培養ディッシュに播種される。

【0233】

あるいは、非破壊的な手順が使用されて、軟骨膜組織から軟骨形成細胞を単離し得る。この手順において、インタクトな外植片組織が細胞培養ディッシュに置かれ、そして増殖培地に播種される。組織内に配置される軟骨形成細胞は、組織から組織プレートの表面に移動し、ここで、これらは、増殖し始める（例えば、Bulstraら, J Orthop. Res. 8:328-335, 1990を参照のこと）。手短には、細かく切られた外植片組織の小片が、組織培養培地を含む組織培養プレートに配置される。好ましい細胞培養培地は、10% FBSで補充されたDMEMを含む。外植片組織を37℃、5% CO_2 で3～7日間インキュベートする。この時間の間、軟骨形成細胞は、外植片組織から組織培養ディッシュの表面に移動する。プレートの表面に再び結合させた後に、細胞を再び増殖させ始める。

【0234】

(c) 骨髄から

軟骨形成細胞（特に、間葉細胞）は、骨髄のサンプルから単離され得る。骨髄からの間葉細胞の単離に有用な手順は、当該分野において周知である（例えば、米国特許第5,197,985号および同第4,642,120号ならびにWakitaniら、J. Bone Joint Surg. 76:579-591, 1994を参照のこと）。

【0235】

例えば、好ましい方法において、骨髄の栓（plug）は、関心の哺乳動物から外科手術的に除去され得、そして細胞培養培地に加えられ得る。好ましい完全な増殖培地は、米国特許第5,197,985号に開示される。次いで、混合物を組織の栓を砕くようにボルテックスする。得られた懸濁液を遠心分離して骨髄細胞を特定の物質の大きな小片（すなわち、骨の断片）から分離する。次いで、細胞を解離させて、16、18および20ゲージのニードルをはめたシリンジを介して細胞を押すことによって単一の細胞懸濁液を得る。次いで、細胞を懸濁液に存在する残りの細胞から間葉細胞より誘導される骨髄を選択的に分離および／または単離するために、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/cm²の細胞密度で組織培養プレートにプレートした。

【0236】

(3. 露出された軟骨形成細胞のインビトロでの増殖)

本明細書中上記のセクション2に記載される方法を使用して、軟骨組織、軟骨膜組織、または骨髄から単離される軟骨形成細胞は、増殖のために単層培養のために置かれ得る。このプロセスによって、単離された軟骨形成細胞の数を増幅し得る。主に、当業者は、基本的に無数の軟骨形成細胞、従って、無数の量の合成軟骨を産生し得る。しかし、増殖の間、軟骨形成細胞が脱分化し、そして軟骨特異的細胞外マトリクスを分泌する能力を失うことが理解される。脱分化した細胞が軟骨形成能力をなお保持するか否かをアッセイする手順は、本明細書中以下に記載される。

【0237】

(a) 細胞増殖

単層培養によって細胞を増殖するためのプロトコルは、当該分野において周知であり（例えば、P o l l a c k（前出）を参照のこと）、従って本明細書中では詳細には記載しない。手短には、単層培養は、一次軟骨形成細胞を播種することによって開始され、軟骨組織または軟骨膜形成組織のいずれかから細胞培養ディッシュに約 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、より好ましくは、約 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、そして最も好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim 10^4$ 細胞 / cm^2 のプレーティング密度で単離する。一つ以上のサイクルの継代を受けた軟骨形成細胞をまた同じプレーティング密度でプレートする。骨髓から単離された一次軟骨形成細胞を、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞 / cm^2 の細胞密度で組織培養プレートにプレートする。一つ以上のサイクルの継代を受けた骨髓からの軟骨形成細胞を約 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、より好ましくは、約 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、そして最も好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim 10^4$ 細胞 / cm^2 のプレーティング密度でプレートする。続いて軟骨形成細胞を、細胞培養培地中で 37、5% CO_2 で培養した。

【0238】

好ましい細胞培養培地には、10% FBS を補充された DMEM が挙げられる。あるいは、10% FBS を補充されたそれぞれ Medium 199 および MCD B 202 の 1 : 1（容積 / 容積）混合物を含む細胞培養培地を使用し得る。本発明の実行に有用ななお別の細胞培養培地は、10% FBS を補充されたそれぞれ DMEM および F 12 の 3 : 1（容積 / 容積）混合物を含む。

【0239】

一旦、細胞培養がコンフルエントになる（すなわち、細胞が、互いに接触するプレートの表面においてこのような密度に増殖する）と、細胞は、継代されそして新たなプレートに播種される。これは、吸引によって細胞単層を覆う細胞培養培地を最初に除去し、そしてリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を用いて細胞単層を洗浄することによって達成され得る。PBS を吸引によって除去し、次いでタンパク質分解酵素（すなわち、0.1% トリプシン）を含む溶液を、単層に注ぐ。タンパク質分解酵素は、細胞をプレートの表面につなぐタンパク質を加水分解し、それによって細胞をプレートの表面から離す。次いで、細胞懸濁液中のタ

ンパク質分解酵素を、懸濁液にFBSを加えることによって不活化して、10%（容積/容積）の最終濃度を得る。次いで、懸濁液中の細胞密度を見積り、そして細胞を1cm²当たり約 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞、より好ましくは、約 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞、そして最も好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 細胞の密度で新たな細胞培養プレートに再びプレートする。継代手順を、十分な細胞が所定のサイズの軟骨の小片を調製するように増殖するまで、複数回（例えば、約7～10回まで）繰り返し得る。

【0240】

増殖された細胞の懸濁液を当該分野で周知の技術を使用して無期限に凍結保存し得ることが理解される。例えば、Pollack（前出）を参照のこと。従って、軟骨形成細胞の集団は、必要が生じた場合いつでも、後の使用のために保存され得る。

【0241】

（b）増殖した細胞の軟骨形成能力についてのアッセイ

脱分化軟骨形成細胞（単層培養で増殖される）をアッセイして、それらがなおそれらの軟骨形成能力を保持するか否かを決定し得る。これは、アガロース培養と呼ばれるプロセスで半固体培地において細胞を培養することによって実行され得る。この手順は、Benyara（Cell 30:215-224、1982）に記載される。手短には、増殖した軟骨形成細胞は、温かい2%低融点アガロース（LTアガロース）（BioRad、Richmond、CA）の溶液に播種される。LTアガロースの使用によって、細胞は、細胞に対して熱損傷なしにアガロースに播種され得る。アガロースを、細胞の添加の前に約39～41に冷却する。約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 細胞を、1mlの液体アガロースに播種する。

【0242】

細胞を、続いて、10%FBSを補充されたDMEMを好ましくは含む細胞培養培地で3～4週間の間、37℃、5%CO₂で培養する。この時間の間、軟骨形成細胞を、細胞外マトリクスを分泌し始めるコロニーを形成するように複製する。得られたコロニーは、アガロースに埋め込まれた小さな「塊（nodule

)」の外観を有する。コロニーを計数し得、そして軟骨形成集団の細胞が当該分野で周知の手順を使用して組織化学的および免疫組織化学的に決定される。

【0243】

組織化学的染色：手短には、細胞を含むアガロースゲルは、PBS中で10%ホルマリンで固定される。次いでサンプルを寒冷カット(cryo-cut)ミクロトーム(American Optical)を用いて8~18 μ mの区分に分画する。一般的な細胞形態学および組織表現型を、当該分野で周知のヘマトキシリン-エオシン法によって区分を染色することによって評価し得る。手短には、得られた区分を10分間、5%エタノール中に溶解したヘマトキシリンを含む染料中でインキュベートする。次いで、区分を水で洗浄し、続いて、45秒間、70%エタノール中の1%エオシンを含む染料中でインキュベートする。次いで、区分を95%エタノールで洗浄する。細胞外マトリクスの塊は、これらの実験条件下で紫色に染色する。

【0244】

細胞外マトリクス中の硫酸化プロテオグリカンは、15~30分間、0.1N塩酸中の1%アルシアンブルーを含む染料中でアガロース粒子をインキュベートすることによって視覚化され得る。あるいは、プロテオグリカンは、15~30分間、1%酢酸中の0.2%サフラニンO/ファストグリーンを含む染料中でアガロース粒子をインキュベートすることによって視覚化され得る。次いで、染色された粒子を、水で洗浄する。細胞外マトリクスに存在する硫酸化プロテオグリカンは、それぞれ2つの方法によって、青色およびオレンジ色に染色する。

【0245】

(免疫組織化学的染色)：軟骨形成細胞を含むアガロース粒子を、低温切断用(cryo-cut)ミクロトーム(American Optical)を用いて8~18 μ mの切片に切片化する。次いで、これらの切片を、細胞外マトリクス上に存在する抗原性エピトープを露出するために酵素的に消化した。好ましい酵素としては、タンパク質分解性酵素プロテアーゼXIV型(Sigma)が挙げられる。手短に言うと、これらのアガロース切片を、0.4mg/mlのプロテアーゼXIV型を含有するTris緩衝化生理食塩水pH7.4(TBS)

中で、室温にて90分間インキュベートする。次いで、得られた切片を、TBSで2回洗浄する。

【0246】

以下を結合するモノクローナル抗体：I型コラーゲン（Chemicon International, Timaacula, CA製のAB745およびMAB1340）；II型コラーゲン（SanBio Inc., Amsterdam, Holland製のPS48；Hybridoma Bank, Baltimore, Md.製のCIIICI）；およびコンドロイチン-6-硫酸（Seikagaku America Inc., Rockville, MD製のMabCs-D）を使用して、アガロース粒子中のこれらの細胞外成分の存在を検出し得る。免疫染色を、VECTASTAIN ABC-APキット（Vector Laboratory）を製造業者の説明書に従って使用して行い得る。

【0247】

（4．合成軟骨パッチの調製）

増殖後、軟骨形成能力をなお有する軟骨形成細胞を、足場依存性様式（すなわち、細胞が接触する細胞接着表面を有するウェルにおいて）；または足場非依存性様式（すなわち、細胞非接着表面を有するウェルにおいて）で培養する。足場依存性様式で増殖拡大される軟骨形成細胞は、通常、脱分化しそして軟骨特異的II型コラーゲンおよび硫酸化プロテオグリカンを分泌する能力を失うことが示唆されている（Schlitzら、前出；Mayneら、前出；Mayneら、前出；Okayamaら、前出；Pacifici & Holtzer、前出；Pacificiら、前出；Westら、前出；von der Mark前出；Oegama & Thompson、前出；Benya & Schaffer、前出）。米国特許第5,786,217号は、未分化軟骨形成細胞が、その細胞接触表面への細胞の接着を阻止する細胞接触表面を有するウェルに播種しそして培養した場合に、これらは、再分化しそして軟骨特異的コラーゲンおよび硫酸化プロテオグリカンの分泌を開始し、これによって、インビトロでの合成軟骨のパッチが形成されることを開示する。

【0248】

さらに、予め成形したウェル中で細胞を培養することが、所定の厚さおよび体積の合成軟骨パッチを製造することを可能にすることが見い出された。しかし、得られた軟骨のパッチの体積は、ウェルの体積のみならずウェルに播種された軟骨形成細胞の数にも依存することが理解される。最適な所定の体積の軟骨は、上述のパラメーターのいずれかまたは両方を変更することによって、慣用的な実験によって調製され得る。

【0249】

((a) 予め成形したウェルの調製)

いくつかのアプローチが、細胞が接触する細胞非接着表面を有する予め成形したウェルを調製するために利用可能である。ウェルの細胞接触表面は、この細胞接触表面への軟骨形成細胞の接着を阻止する分子でコートされ得る。好ましいコーティング試薬としては、シリコンベースの試薬（例えば、ジクロロジメチルシラン）またはポリテトラフルオロエチレンベースの試薬（例えば、TeflonTM）が挙げられる。シリコンベースの試薬（特に、ジクロロジメチルシラン）で材料をコートするための手段は、当該分野で周知である。例えば、Sambrookら（1989）「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press（この開示は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。ウェル表面への細胞の接着を妨げる他の生体適合性の試薬が、本発明の実施に有用であり得ることが理解される。

【0250】

あるいは、ウェルは、それ自体で細胞の接着を可能にしない、成形可能（pliable）または鋳造可能（moldable）な生体適合性の材料から鋳造され得る。このような細胞接着を妨げる好ましい材料としては、アガロース、ガラス、未処理の細胞培養プラスチックおよびポリテトラフルオロエチレン（例えば、Teflon（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。未処理の細胞培養プラスチック（例えば、静電荷を有する材料で処理されていないかまたはこのような材料から作製されていないプラスチック）は、市販されており、例えば、Falcon Labware, Becton-Dickinson

, Lincoln Park, N. J. から購入され得る。しかし、上述の材料は、限定することを意味されない。軟骨形成細胞の接着を本来阻止する、任意の他の成形可能または鑄造可能な生体適合性の材料が、本発明の実施において有用であり得ることが理解される。

【0251】

ウェルのサイズおよび形状は、修復されるべき関節の軟骨欠陥のサイズおよび形状によって決定され得る。例えば、ウェルは、 25 cm^2 の断面積を有し得ることが意図される。これは、成体のヒト大腿軟骨顆 (chondyle) の平均断面積である。従って、大腿軟骨顆の全体を再現するために、本発明の方法に従って、合成軟骨の単一の小片を調製し得ることが理解される。ウェルの深さは、好ましくは、約 0.3 cm より大きく、そして好ましくは、約 0.6 cm の深さである。成体の咬合関節における天然の関節軟骨の厚さは、通常、約 0.3 cm である。従って、ウェルの深さは、約 0.3 cm の軟骨パッチが形成するのを可能にするに十分大きくあるべきである。しかし、ウェルはまた、この軟骨パッチを覆う増殖培地を含むに十分な深さである。

【0252】

本発明に従って調製される大きい片の軟骨が、その損傷軟骨の外科的修復を行う外科医によって、予め選択したサイズおよび形状に「切り取られ」得ることもまた意図される。切り取りは、鋭い切断器具（例えば、小刀、鋏、または切断刃を備えた関節鏡検査デバイス）の使用によって、当該分野で周知の手順を使用して行われる。

【0253】

予め成形したウェルは、好ましくは、無菌条件下でアガロースゲルのブロックに鑄造される。アガロースは、経済的であり、生体適合性であり、成形可能であり、そして鑄造可能な材料であり、これを使用して、予め成形したウェルを迅速かつ容易に鑄造し得る。上記のように、ウェルの寸法は、所望の得られる軟骨栓子のサイズに依存し得る。

【0254】

予め成形したウェルは、溶融LTアガロース (BioRad) の熱い溶液を、

シリンダーを備える組織培養ディッシュに注ぐことによって調製され得る。このシリンダーは、形成されるべきウェルの形状を反映する寸法を有する。ウェルのサイズおよび形状は、当業者によって選択され得、これは、修復されるべき関節軟骨欠陥の形状に依存し得る。一旦アガロースが冷却しそしてシリンダー周辺で固化すると、シリンダーを鉗子で注意深く取り外す。シリンダーの取り外しによって露出される組織培養ディッシュの表面は、溶融アガロースで覆われる。これは、ウェルの底を封鎖し、そしてウェルの基部に細胞接着表面を提供する。この新たに添加した溶融LTアガロースが冷却および固化すると、この得られた予め成形したウェルは、培養、および増殖された軟骨形成細胞の再分化の刺激に適切である。しかし、代替的な方法を使用して、本発明の実施に有用な予め成形したウェルを調製し得ることが理解される。

【0255】

((b) 軟骨パッチの増殖)

引き続いて、懸濁液中の増殖された軟骨形成細胞[本明細書中の上記3(a)節]を、この予め成形したウェルに播種しそしてこのウェルにおいて培養する。細胞を、1mlあたり約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ の増殖された軟骨形成細胞、より好ましくは、1mlあたり約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 細胞、そして最も好ましくは、1mlあたり約 $3 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$ 細胞の細胞密度に、細胞培養培地の添加によって希釈する。好ましい細胞培養培地は、10% FBSを補充したDMEMを含む。あるいは、それぞれ1:1(容量/容量)のMedium 199およびMCDB 202の混合物を含む、10%のFBSで補充した細胞培養培地が使用され得る。本発明の実施に有用であるなお別の細胞培養培地は、10%のFBSを補充した、それぞれ3:1(容量/容量)のDMEMおよびF12の混合物を含む。

【0256】

約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ 細胞、好ましくは、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細胞、そして最も好ましくは、約 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 細胞が、 1 mm^3 容量の合成軟骨の小片を生成する。従って、当業者は、予め成形したウェルに適切な数の軟骨形成細胞を播種することによって、予め決定されたサイズの合成軟骨のパッチを生成

し得る。引き続き、細胞を、37、5% CO₂で、1～90日間、好ましくは、5～60日間、そして最も好ましくは、10～30日間培養し、軟骨特異的Ⅱ型コラーゲンおよび硫酸化プロテオグリカンの分泌を可能にし、それによってインビトロで合成軟骨の形成をする。細胞培養培地を、1日おきにウェルから除去しそして新鮮な細胞培養培地で置き換え、細胞の最適な生存性を維持する。

【0257】

ウェルへの増殖された軟骨形成細胞の播種の約4時間以内に、細胞は融合し、細胞の接着性栓子を形成する。この接着性栓子における細胞は、Ⅱ型コラーゲンを最初に分泌する。約4～10日後、これらの細胞は、軟骨特異的な硫酸化プロテオグリカンおよびⅡ型コラーゲンの分泌を開始する。サンプル時間に経時的に、Ⅱ型コラーゲン合成のレベルは減少する。長期間の培養後、ウェル中の軟骨形成細胞によって発現されるコラーゲンは、主に、Ⅱ型コラーゲンである。しかし、4時間以内に形成されたこの細胞の粘着性栓子をウェルから取り出し、そして軟骨欠陥に外科的に移植することが意図される。この未分化の軟骨形成細胞は、その後、インサイチュで再分化され得、それによって、関節内で合成軟骨を形成することが理解される。

【0258】

予め成形したウェル中に形成された、得られた合成軟骨組織を、関節への移植の前に、本明細書中上記に記載の手順を使用して、生化学的または形態学的にアッセイし得る。手短に言うと、この合成軟骨を、低温切断用ミクロトーム (American Optical) を用いて8～18 μmの切片に切片化し得、そして得られた切片を、3(b)節に記載の手順を使用して染色し得る。

【0259】

ポリペプチド増殖因子を予め成形したウェル中の軟骨形成細胞に添加して、関節軟骨特異的なプロテオグリカンおよび/またはコラーゲンの産生を増強または刺激し得ることが意図される(例えば、Luyten & Reddi (1992) 「Biological Regulation of the Chondrocytes」、CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, and Tokyo、227-236頁を参照のこと

)。好ましい増殖因子としては、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)、インスリン様増殖因子 (IGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮増殖因子 (EGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、骨形態形成因子 (BMP) (すなわち、BMP - 1、BMP - 2、BMP - 3、BMP - 4、BMP - 5およびBMP - 6) および骨原性タンパク質 (OP) (すなわち、OP - 1、OP - 2およびOP - 3) が挙げられるが、これらに限定されない。TGF β 、IGF、PDGF、EGF、aFGF、bFGF、HGFおよびKGFの好ましい濃度は、約1 ~ 100 ng/ml、より好ましくは、約5 ~ 約50 ng/ml、そして最も好ましくは、約10 ~ 約20 ng/mlの範囲である。BMPおよびOPの好ましい濃度は、約1 ~ 約500 ng/ml、より好ましくは、約50 ~ 約300 ng/ml、そして最も好ましくは、約100 ~ 約200 ng/mlの範囲である。しかし、これらの特定の因子に限定されない。軟骨特異的プロテオグリカンおよびコラーゲンの産生を刺激または誘導し得る任意のポリペプチド増殖因子が、本発明の実施において有用であり得る。さらに、アスコルベートを予め成形したウェル中の軟骨形成細胞に添加して、軟骨特異的プロテオグリカンおよびコラーゲンの産生を増強または刺激し得ることが意図される。アスコルベートの好ましい濃度は、約1 ~ 約1000 μ g/ml、より好ましくは、約20 ~ 約500 μ g/ml、そして最も好ましくは、約50 ~ 約100 μ g/mlの範囲である。

【0260】

(5. 関節軟骨欠陥の外科的修復)

哺乳動物における軟骨欠陥は、関節鏡検査または関節の切開手術の間に可視的に容易に同定可能である。軟骨欠陥はまた、コンピューター断層撮影法 (CATスキャニング)、X線検査、磁気共鳴画像法 (MRI)、滑液または血清マーカーの分析、または当該分野で公知の他の手段によって、推測的に同定され得る。欠陥の処置は、当該分野で公知の関節鏡手段または切開手術手段の間に行われ得る。従って、一旦欠陥が同定されると、その欠陥は、以下の工程によって処置され得る：(1) 本明細書中に記載の方法によって調製した合成関節軟骨の薄片を

、所定の部位に外科的に移植する工程、および(2)その合成関節軟骨を所定の部位に統合させる工程。

【0261】

合成軟骨パッチは、必要に応じて、そのパッチが欠陥に移植されたときに、移植された組織の縁が、欠陥の縁と直接的に接触するような、サイズおよび形状を有する。さらに、合成軟骨パッチは、外科手段の間に定位置に(in placed)固定され得る。これは、生分解性の縫合糸(すなわち、例えば、Ethicon, Johnson & Johnsonから入手可能な)でその欠陥にパッチを外科的に固定することによって、そして/またはそのパッチと欠陥の接触領域に生体接着剤(bioadhesive)を塗布することによって、行われる。好ましい生体接着剤としては、Fr.特許第2448900号;Fr.特許第2448901号およびEP.S.N.88401961.3に開示されるものと類似の、フィブリン-トロニン接着剤および米国特許第5,197,973号に開示されるような合成生体接着剤が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、代替的なタイプの縫合糸および生体適合性の接着剤が、本発明の実施に有用であり得ることが意図される。

【0262】

いくつかの例において、損傷された関節軟骨は、合成軟骨のパッチの移植前に外科的に露出され得る。さらに、関節軟骨欠陥への合成軟骨パッチの接着は、トランスグルタミナーゼでその欠陥を処理することによって増強され得る(Ichinoser, J. Biol. Chem. 265:13411-13414, 1990; Najjar, 「Transglutaminases」、Boston, Martinuse-Nijhoff, 1984)。最初に、この軟骨の欠陥を、例えば、コットンを使用して乾かし、そしてトランスグルタミナーゼの溶液で満たす。その後、この溶液を、例えば、吸引によって除去し、トランスグルタミナーゼを含む膜をこの軟骨上に残す。その後、合成軟骨パッチを、上記の方法によって欠陥に移植する。

【0263】

合成軟骨パッチは、好ましくは、同種異系であり、最も好ましくは、自原性性

質である。従って、合成の同種異系軟骨は、意図されるレシピエントと同じ種に属する哺乳動物から単離された生検組織から調製され得る。合成の自原性軟骨は、意図されるレシピエント由来の生検組織から調製され得る。さらに、合成軟骨は、ヒト関節軟骨欠陥の修復に有用であり得る。従って、軟骨形成細胞は、以下から単離され得る：ヒト軟骨組織（例えば、ヒト関節軟骨（体重がかかる（weight-bearing）関節および体重がかからない（non-weight-bearing）関節由来）、ヒト肋軟骨、ヒト鼻軟骨、ヒト耳介軟骨、ヒト気管軟骨、ヒト喉頭蓋軟骨、ヒト甲状軟骨、ヒト披裂軟骨およびヒト輪状軟骨）；ヒト軟骨膜組織（例えば、ヒト肋軟骨、ヒト鼻軟骨、ヒト耳介軟骨、ヒト気管軟骨、ヒト喉頭蓋軟骨、ヒト甲状軟骨、ヒト披裂軟骨およびヒト輪状軟骨の表面からサンプリングされた軟骨膜組織）；またはヒト骨髓。関節軟骨欠陥の修復を行う外科的手段は、当該分野で周知である。例えば、Luyten & Reddi、「Biological Regulation of the Chondrocytes」、CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, & Tokyo、227-236頁、1992を参照のこと。

【0264】

前述の手段の種々の改変は、当該分野で公知であり、本発明の方法に含まれ得る。例えば、米国特許第4,846,835号は、3次元コラーゲンマトリクス上への自己軟骨細胞の播種を開示し、次いで、この3次元コラーゲンマトリクスは、関節軟骨病変の部位にインビボで挿入され、そして縫合した骨膜皮弁を使用して定位置で固定される。米国特許第5,041,138号は、移植のための3次元性分解性マトリクス上へ軟骨細胞を播種するか、またはインビトロで遊離の軟骨細胞を増殖させることによる、軟骨構造のインビトロ増殖を開示し、次いでこれは、損傷部位に直接投与される。米国特許第5,723,331号および同第5,786,217号は、軟骨パッチを調製しそして軟骨細胞を含む組成物を移植するための、方法および組成物を開示する。米国特許第5,736,372号、同第5,902,741号および同第5,932,459号は、軟骨細胞に適応し得そして所望の形状に鑄造され得るかまたは形付けられ得る、3次元合成

ポリマー繊維マトリクスを調製する方法を開示する。米国特許第5,928,945号は、ずれ流動応力の適用によって、培養軟骨細胞において、増強された軟骨細胞機能を維持するための方法および材料を開示する。

【0265】

(C. 軟骨細胞のミトコンドリア機能を改善するための処理)

軟骨細胞を、所望の軟骨細胞、すなわち、改善されたミトコンドリア機能を有する軟骨細胞、を生成または選択するために、以下の様式の1以上においてエキソビボで処理する。

【0266】

(1. サイブリッド)

軟骨細胞のミトコンドリア機能を改善する1つの方法は、軟骨細胞からその内因性ミトコンドリアDNA (mtDNA) を枯渇させρ-ゼロ細胞を生成する工程、および、その後、このようなρ-ゼロ細胞に、関節障害を有さないかまたは関節障害に対する素因のないことが既知の動物由来のミトコンドリアを導入する工程を包含する。従って、得られた細胞ハイブリッド(すなわち、サイブリッド)は、親軟骨細胞由来の核成分および健常な動物由来のミトコンドリア成分を有する。これらのサイブリッド軟骨細胞は、改善されたミトコンドリア機能を有し、そして結果として軟骨細胞媒介性の関節に限定的な活性をより良好に及ぼすことが予測される。エキソビボで操作される軟骨細胞が、それらが最終的に再導入される動物と同じ動物から誘導される場合、本発明の方法は、その移植される細胞の免疫反応性についての可能性の減少に起因する、改善された結果の利点を提供する。すなわち、ある動物由来の操作された軟骨細胞は、その動物の免疫系からの応答を誘発することは予測されない。この利点は、このような方法の有効性を改善する。なぜなら、その移植される軟骨細胞は、その動物において、より多数でそして/またはより長い期間維持されることが予測され、そしてまた、免疫応答およびその後の事象に起因する、このような処置の所望でない副作用の可能性を減少するからである(Hycら、Cell Transplant. 6:119-124、1997; Romanukら、Transpl. Immunol. 3:251-257, 1995)。

【0267】

p - ゼロ細胞およびサイブリッド細胞を調製および使用するための方法は、以下に記載される：米国特許第5,840,493号および同第5,888,438号、公開PCT出願WO95/26973およびWO98/17826、KingおよびAttardi (Science 246:500-503, 1989)、Chomynら (Mol. Cell. Biol. 11:2236-2244, 1991)、Millerら (J. Neurochem. 67:1897-1907, 1996)、Swerdlowら (Annals of Neurology 40:663-671, 1996)、Cassarinoら (Biochim. Biophys. Acta 1362:77-86, 1997)、Swerdlowら (Neurology 49:918-925, 1997)、Sheehanら (J. Neurochem. 68:1221-1233, 1997) および Sheehanら (J. Neurosci. 17:4612-4622, 1997)。比較的短い時間でp - ゼロ細胞を迅速に得る方法（これは、いくつかの状況下で所望され得る）は、同時係属米国特許出願番号09/069,489および同09/301,517に記載される。軟骨パッチにおけるサイブリッドの使用に関して、軟骨細胞が、外因性ミトコンドリアの導入前にそれらの内因性ミトコンドリアDNAが必ずしも枯渇される必要がない（すなわち、p - ゼロ細胞に変換される必要のない）こと、および、得られたサイブリッドが、おそらくそれらのmtDNAに関して異原性（heteroplasmic）であるが、にもかかわらず、それらが由来する軟骨細胞と比較して増強されたミトコンドリア機能を有し得ることが理解される。

【0268】

この型のエキソビボ操作は、患者の軟骨細胞に存在するミトコンドリアゲノムの配列が、ミトコンドリア機能に影響を与える1以上の変異を含むことが示されている場合に、特に有用であることが、当業者に認識される。これらの例において、非変異体ミトコンドリアゲノムを含むサイブリッドの導入は、遺伝子治療のユニークな形態を表す。変異についてミトコンドリアDNA（mtDNA）を試験するための方法は、例えば、同時係属米国特許出願番号60/130,447

(代理人整理番号660088.426P1)に記載される。

【0269】

((b) ミトコンドリア保護剤での処理)

改善されたミトコンドリア機能を有する所望の軟骨細胞を生成するために軟骨細胞をエキソビボで処理する別の様式は、軟骨パッチの調製の1以上の段階の間に、本明細書中に提供されるような1以上のミトコンドリア保護(ミトコンドリア保護性の(mitoprotective))薬剤を、軟骨細胞に接触させることである。このような(ミトコンドリア保護性の)薬剤としては、例として、関節障害の処置のための本明細書中に示される抗酸化剤および抗アポトーシス剤が挙げられるが、これらに限定されない。上記の方法の1以上を使用してアッセイされる、軟骨細胞機能を増強するミトコンドリア保護剤が好ましい。インビボで軟骨細胞のミトコンドリア機能をさらに増強するために、軟骨細胞の移植後に被験体または患者に1以上のミトコンドリア保護剤を投与することもまた望ましくあり得る。

【0270】

((c) ミトコンドリアにおいて優れた軟骨細胞の富化)

改善されたミトコンドリア機能を有する所望の軟骨細胞を生成するために軟骨細胞をエキソビボで処理する別の様式は、比較的増強されたミトコンドリア機能を有する軟骨細胞を選択して、ミトコンドリアにおいて優れた軟骨細胞が富化された集団を調製するである。増強された軟骨細胞機能を有する軟骨細胞のこの富化された集団を使用して、その特徴が1以上の所望の特性(例えば、関節損傷部位へのより迅速な接着および修復、増強されたECM産生、インビトロまたはインビボでの長期の安定性など)を有する軟骨パッチを調製する。

【0271】

種々の方法を使用して、増強されたミトコンドリア機能を有する軟骨細胞を選択し得る。例えば、ロードミン123を接触した細胞の蛍光細胞分析分離(FACS)(これは、ミトコンドリア膜電位($\Delta\psi_m$)の関数としてミトコンドリアに取り込まれる)は、 $\Delta\psi_m$ に従って細胞を選別するために使用されている(例えば、al-Rubeaiら、Cytotechnology 7:179-1

86, 1991を参照のこと)。種々の細胞型が、この方法によって選別されており、これらとしては、ヒト線維芽細胞(Martinezら、Exp. Cell Res. 164:551-555, 1993)、ヒト精子(Augerら、J. Histochem. Cytochem. 41:1247-1251, 1993)、リンパ球(Darzynkiewiczら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2383-2387, 1981)、T細胞(Ferliniら、Cytrometry 21:284-293, 1995)およびサイブリッド(Kliot-Fieldsら、Somatic Cell Genet. 9:375-389, 1983)が挙げられる。

【0272】

ミトコンドリア機能に従って細胞を選別するために使用され得る他の方法としては、カルボキシ-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテートおよびMitochondria Tracker™ CM-H₂Mros (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)をロードした細胞の蛍光細胞分析分離(FACS)が挙げられる。この蛍光シグナルは、酸化ストレス状態を反映する(Karbowskiら、Biochim. Biophys. Acta 1449:25-40, 1999)。さらなる例として、10-Nノニルアクリジンオレンジ(NAO)をロードした細胞のFACSを使用して、ミトコンドリア含量に基づいて細胞を選別し得る(Petitら、Cytrometry 19:304-312, 1995)。

【0273】

ヒトにおけるそれらの使用の前に、本発明に従う軟骨細胞を含む組成物を、関節障害のイヌ、ラット(Hycら、Cell Transplant. 6:119-124, 1997; Romaniukら、Transpla. Immunol. 3:251-257, 1995; Moskalowskiら、Cell Transplant. 2:467-473, 1993)、ウサギ(Brittbargerら、Clin. Orthop.:270-283, 1996)またはトランスジェニック動物モデルのような、動物モデルにおいて評価する(例えば、米国特許第5,675,060号を参照のこと)。

【0274】

前述から、本発明の特定の実施形態を例示目的で本明細書中に記載してきたが、種々の改変が、本発明の精神および範囲を逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、関節の軟骨細胞およびTC28細胞の生存性、および細胞内ATP濃度に対する、アンチマイシンおよびオリゴマイシンの用量依存性の影響を示す。

【図2】

図2は、培養された軟骨細胞によるコラーゲンの合成に対するミトコンドリアインヒビターの影響を示す。

【図3】

図3は、培養された軟骨細胞（図3A）およびTC28細胞（図3B）によるプロテオグリカンの合成に対する、ミトコンドリアインヒビターの影響を示す。

【図4】

図4は、培養された軟骨細胞による無機ピロリン酸（Ppi）の合成に対するミトコンドリアインヒビターの影響を示す。

【図5】

図5は、マトリックス小包（MV）によって媒介される石灰化に対するミトコンドリアインヒビターの影響を示す。

【図6】

図6は、SIN-1（NOドナー）の存在下でのTC28細胞の生存性を示す。

【図7】

図7は、NOC-12（NOドナー）の存在下でのTC28細胞の生存性を示す。

【図8】

図8は、NOC-12（NOドナー）の存在下でのTC28の細胞内ATPレベルを示す。

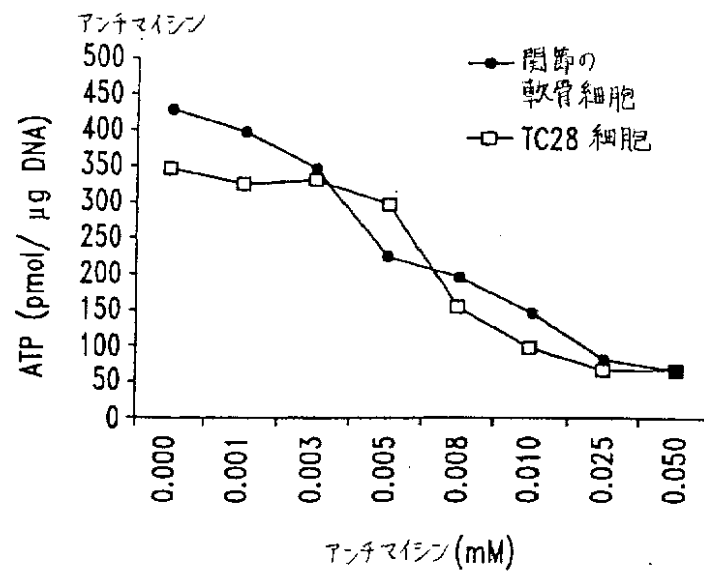
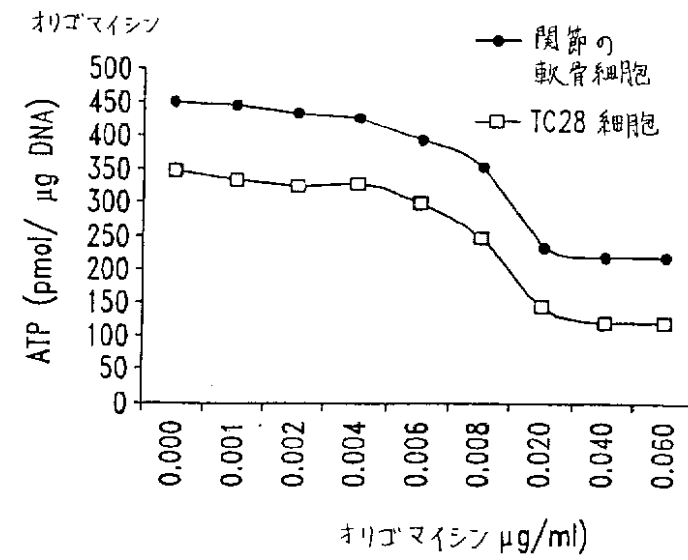
【図9】

図9は、NOC - 12 (NOドナー) の存在下でのTC28細胞の生存性を示す。

【図10】

図10は、TC28細胞によるIL - 1によって刺激されたGAGの放出を示す。

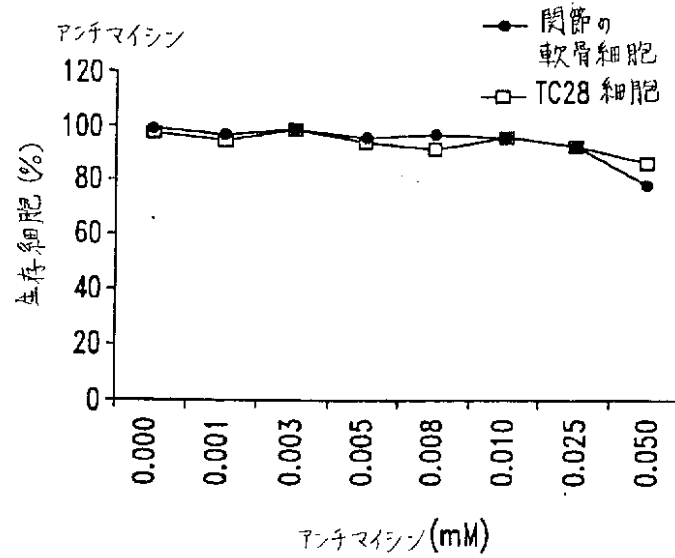
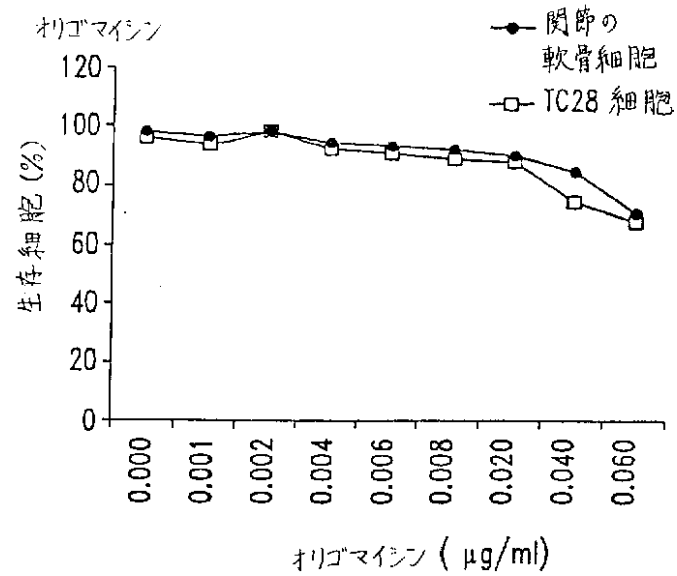
【図1A】



1A

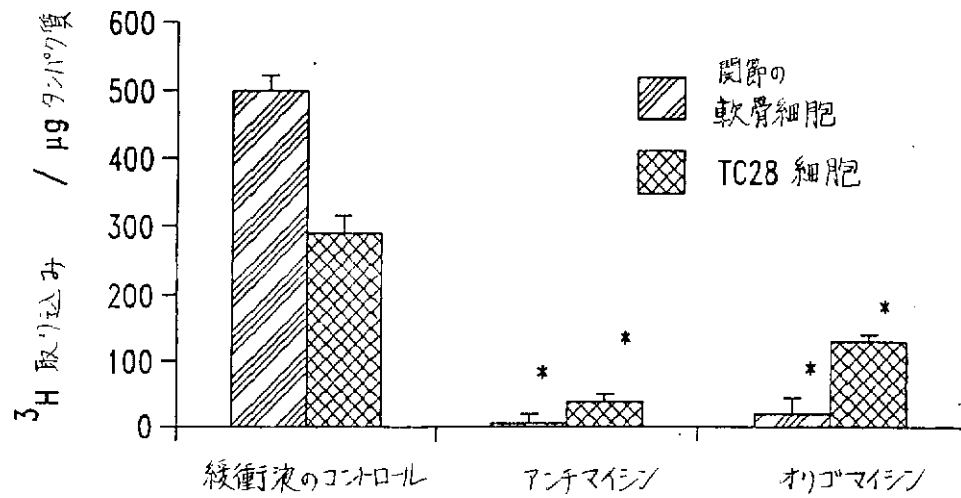
【図1B】

(図1の系統き)

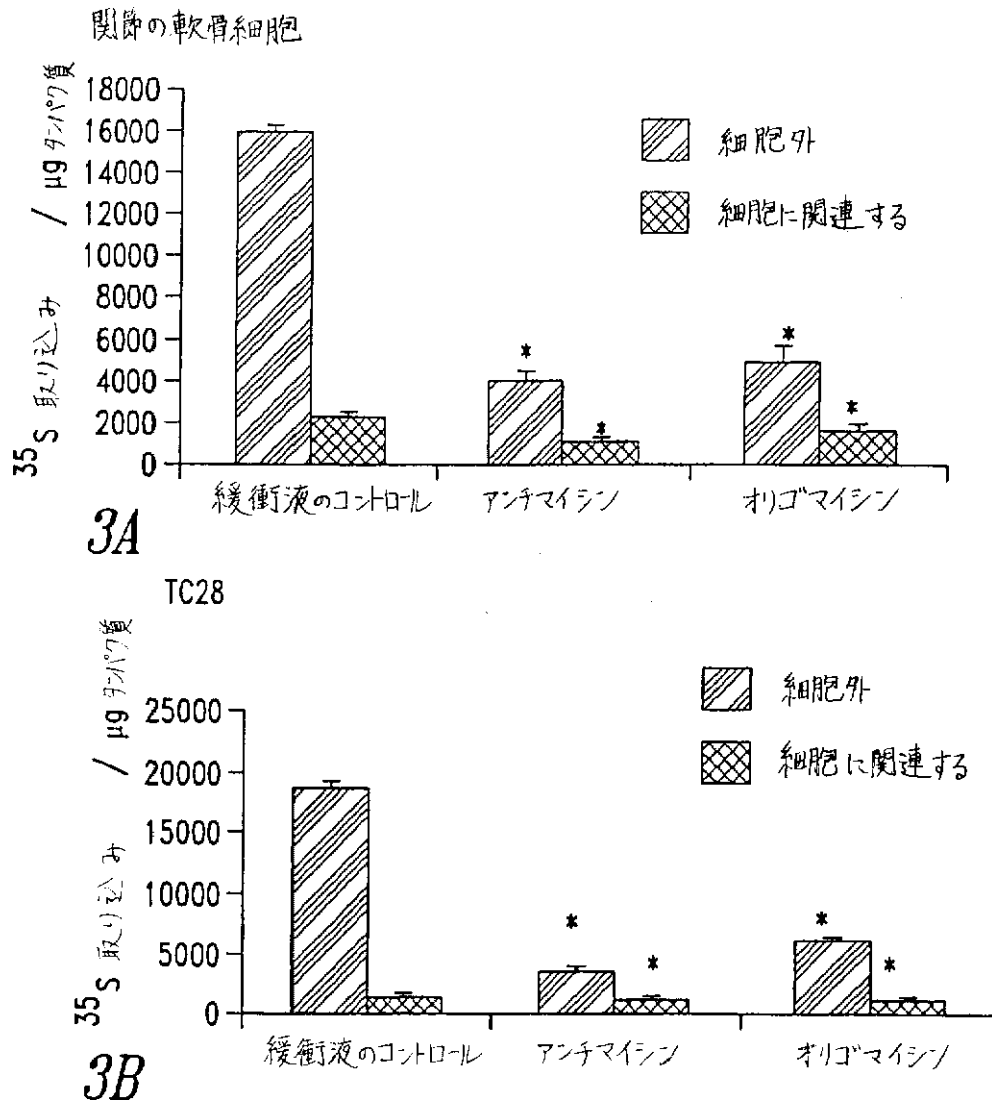


1B

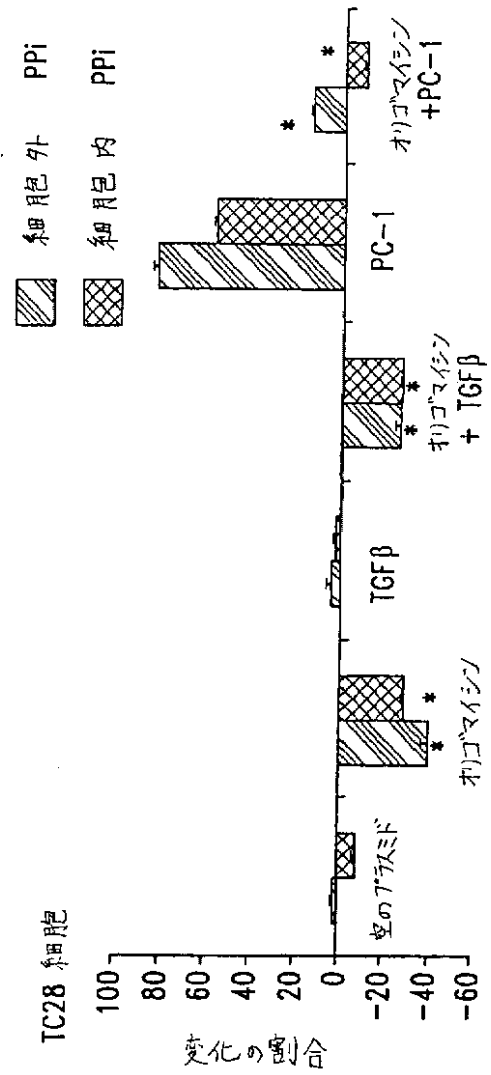
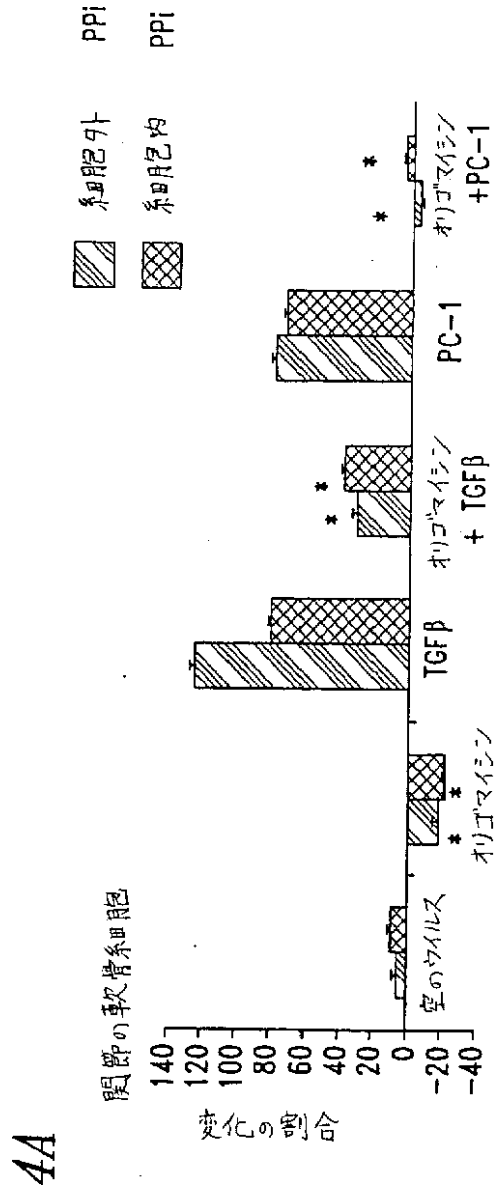
【図2】



【図3】

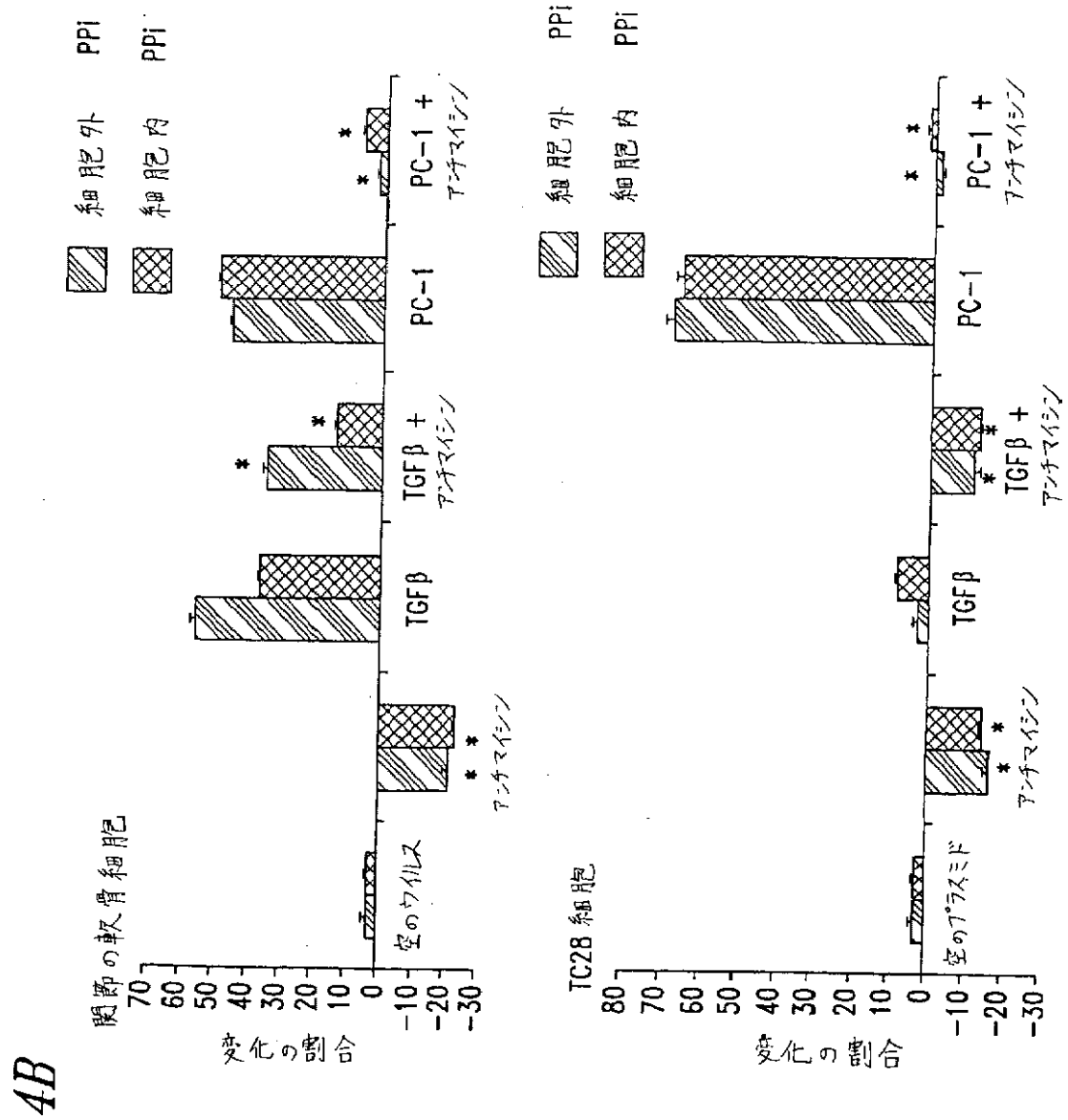


【図4A】

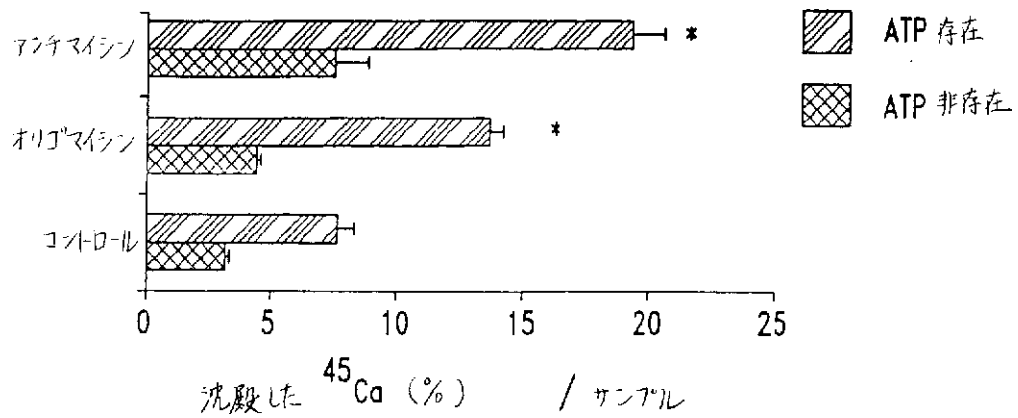


【図4B】

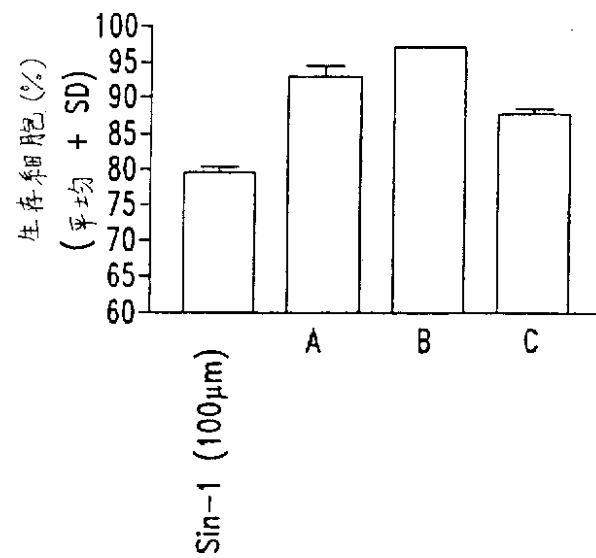
(図4の続き)



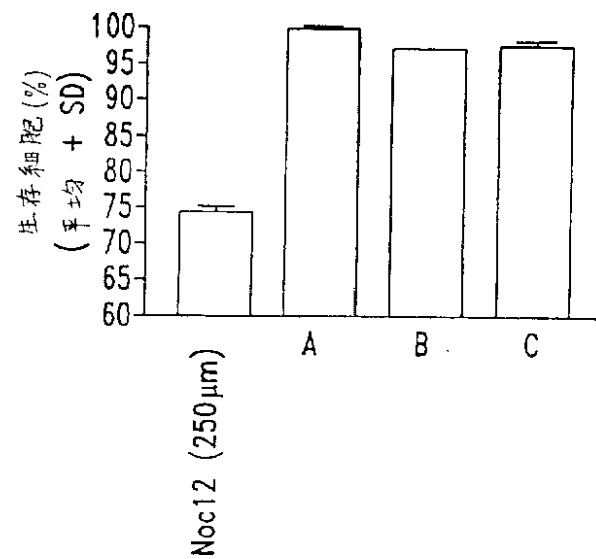
【図5】



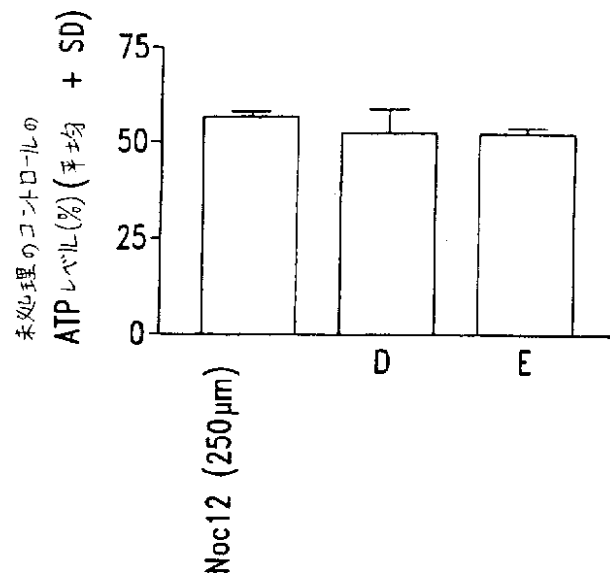
【図6】



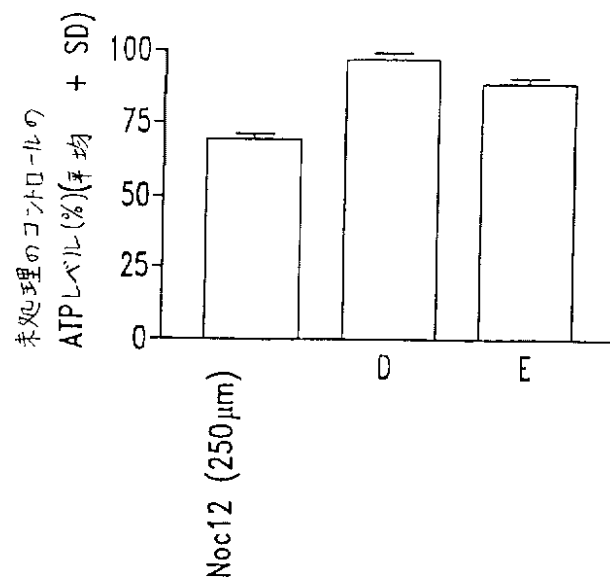
【図7】



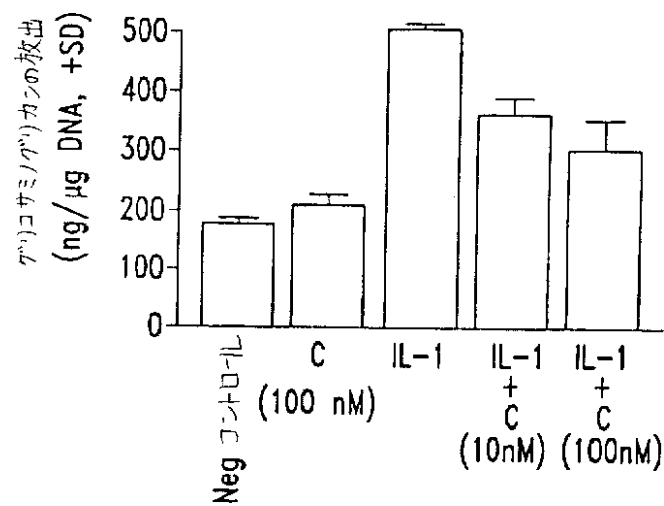
【図8】



【図9】



【図10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/25317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/50 601N33/68 C12Q1/66		
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) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHNSON KRISTEN ET AL: "Differential mechanisms of inorganic pyrophosphate production by plasma cell membrane glycoprotein-1 and B10 in chondrocytes." ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 42, no. 9, 1999, pages 1986-1997, XP000991044 ISSN: 0004-3591 cited in the application	1-12, 15-20, 22,104
A	the whole document --- -/--	39-52
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 October 2001		22. 10. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Hart-Davis, J

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TERKELTAUB ROBERT ET AL: "Causal link between nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate generation demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with plasma cell membrane glycoprotein-1: Relevance to calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 37, no. 6, 1994, pages 934-941, XP000991051 ISSN: 0004-3591 cited in the application the whole document	1-12, 15-20, 104
X	ROSEN FRED ET AL: "Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: Increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation." ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 40, no. 7, 1997, pages 1275-1281, XP000991022 ISSN: 0004-3591 cited in the application the whole document	1-12, 15-20, 104
X	CHICHESTER C O ET AL: "Immunological detection of type II collagen degradation: Use in the evaluation of anti-arthritis therapies." JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 48, no. 7, 1996, pages 694-698, XP000991040 ISSN: 0022-3573 the whole document	1-12,18, 19,21, 104
X	PULLIG O ET AL: "Metabolic activation of chondrocytes in human osteoarthritis - Expression of type II collagen." ZEITSCHRIFT FUER ORTHOPAEDIE UND IHRE GRENZGEBIETE, vol. 137, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 67-75, XP000991048 ISSN: 0044-3220 page 71; figure 3	1-12,18, 19,21, 104
X	US 5 935 796 A (FOSANG AMANDA JANE) 10 August 1999 (1999-08-10) the whole document	1-12,104
X	EP 0 745 850 A (SEIKAGAKU KOGYO CO LTD) 4 December 1996 (1996-12-04) the whole document	1-12,104

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN BEUNINGEN HENK M ET AL: "Transforming growth factor-beta-1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint." LABORATORY INVESTIGATION, vol. 71, no. 2, 1994, pages 279-290, XP000991038 ISSN: 0023-6837 cited in the application the whole document	1-12, 15, 18-20, 104
X	--- PALMOSKI M J ET AL: "MARKED SUPPRESSION BY SALICYLATE OF THE AUGMENTED PROTEO GLYCAN SYNTHESIS IN OSTEO ARTHRITIC CARTILAGE" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 23, no. 1, 1980, pages 83-91, XP000991404 ISSN: 0004-3591 the whole document	1-12, 104
X	--- CORVO M LUISA ET AL: "Intravenous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes: II. In vivo fate in a rat model of adjuvant arthritis." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1419, no. 2, 15 July 1999 (1999-07-15), pages 325-334, XP000991006 ISSN: 0006-3002 abstract	1-12, 83-85, 104
P, X	--- GALLERON S ET AL: "Reactive oxygen species induce apoptosis of synoviocytes in vitro. alpha-Tocopherol provides no protection." CELL BIOLOGY INTERNATIONAL., vol. 23, no. 9, 1999, pages 637-642, XP000991538 ISSN: 1065-6995 the whole document	1-12, 83-85, 104
	--- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRIFFEY R H ET AL: "DEPLETION OF HIGH-ENERGY PHOSPHATES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS, AS DETERMINED BY PHOSPHORUS-31 NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 33, no. 6, June 1990 (1990-06), pages 827-833, XP001023597 ISSN: 0004-3591	1-10,104
A	abstract	39-52
X	NORDEMAR R ET AL: "MUSCLE ATP CONTENT IN RHEUMATOID ARTHRITIS - A BIOPSY STUDY" SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 34, no. 2, 1974, pages 185-191, XP001023595 ISSN: 0085-591X	1-10,104
A	abstract	39-52
X	MARINELLO E ET AL: "THE PURINE NUCLEOTIDE CONTENT OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY RESEARCH, BIOSCIENCE EDIPRINT, GENEVA,, CH, vol. 14, no. 2, 1994, pages 57-63, XP001023619 ISSN: 0251-1649	1-10,104
A	abstract; table 3	39-52
X	YAMADA E ET AL: "DIFFERENTIAL DISPLAY ANALYSIS OF MURINE COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS: CLONING OF THE CDNA-ENCODING MURINE ATPASE INHIBITOR" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, vol. 92, no. 4, December 1997 (1997-12), pages 571-576, XP001016129 ISSN: 0019-2805	1-10,104
A	abstract	44-46,50
X	BOOS N ET AL: "IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TYPE X-COLLAGEN EXPRESSION IN OSTEOARTHRITIS OF THE HIP JOINT" JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY, INC.,, US, vol. 17, no. 4, July 1999 (1999-07), pages 495-502, XP001023670 ISSN: 0736-0266 the whole document	1-12,18, 20,21, 104

International Application No
PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category "	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARK VON DER K ET AL: "TYPE X COLLAGEN SYNTHESIS IN HUMAN OSTEOARTHRITIC CARTILAGE INDICATION OF CHONDROCYTE HYPERTROPHY" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 35, no. 7, July 1992 (1992-07), pages 806-811, XP001023714 ISSN: 0004-3591 the whole document	1-12,18, 20,21, 104
X	ISHII TAKAO ET AL: "Effect of growth factors and cytokines on experimentally-induced osteoarthritic chondrocytes." NIHON UNIVERSITY JOURNAL OF MEDICINE, vol. 40, no. 5, October 1998 (1998-10), pages 245-255, XP001025735 ISSN: 0546-0352 the whole document	1-12,18, 20,21, 104
X	GLANSBEEK H L ET AL: "STIMULATION OF ARTICULAR CARTILAGE REPAIR IN ESTABLISHED ARTHRITIS BY LOCAL ADMINISTRATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA INTO MURINE KNEE JOINTS" LABORATORY INVESTIGATION, UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, BALTIMORE,, US, vol. 78, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 133-142, XP001023703 ISSN: 0023-6837 the whole document	1-12,15, 18-20, 104
X	LAFEBER F P J G ET AL: "TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA PREDOMINANTLY STIMULATES PHENOTYPICALLY CHANGED CHONDROCYTES IN OSTEOARTHRITIC HUMAN CARTILAGE" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, TORONTO, CA, vol. 24, no. 3, 1997, pages 536-542, XP001023704 ISSN: 0315-162X the whole document	1-12,15, 18-20, 104
X	DOYLE D V: "TISSUE CALCIFICATION AND INFLAMMATION IN OSTEOARTHRITIS" JOURNAL OF PATHOLOGY, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 136, no. 3, 1982, pages 199-216, XP001023749 ISSN: 0022-3417 page 199	1-12,18, 20,104

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEUNG H S ET AL: "SPECIFIC INHIBITION OF BASIC CALCIUM PHOSPHATE AND CALCIUM PYROPHOSPHATE CRYSTAL-INDUCTION OF METALLOPROTEINASE SYNTHESIS BY PHOSPHOCITRATE" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1315, no. 2, 1996, pages 105-111, XP001023752 ISSN: 0006-3002 page 105 ---	1-12,18, 20,104
X	ALI S Y: "APATITE-TYPE CRYSTAL DEPOSITION IN ARTHRITIC CARTILAGE" SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, CHICAGO, IL, US, no. 4, 1985, pages 1555-1566, XP001025737 page 1561, column 2, paragraph 2 ---	1-12,18, 20,104
X	ROSENTHAL A K: "CALCIUM CRYSTAL-ASSOCIATED ARTHRITIDES" CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY, CURRENT SCIENCE, LONDON, GB, vol. 10, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 273-277, XP001023750 ISSN: 1040-8711 page 276, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 2 ---	1-12,18, 20,104
X	JOHNSON K ET AL: "MATRIX VESICLE PLASMA CELL MEMBRANE GLYCOPROTEIN-1 REGULATES MINERALIZATION BY MURINE OSTEOBLASTIC MC3T3 CELLS" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 883-892, XP001023751 ISSN: 0884-0431 page 885, column 1, paragraph 4 ---	1-12,18, 20,104
P,X	JOHNSON K ET AL: "MITOCHONDRIAL OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IS A DOWNSTREAM REGULATOR OF NITRIC OXIDE EFFECTS ON CHONDROCYTE MATRIX SYNTHESIS AND MINERALIZATION" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 43, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 1560-1570, XP001023837 ISSN: 0004-3591 the whole document --- -/--	1-12,23, 24,53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	TOMITA M ET AL: "NITRIC OXIDE REGULATES MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND FUNCTIONS OF ARTICULAR CHONDROCYTES" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 44, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 96-104, XP001023828 ISSN: 0004-3591 the whole document ---	1-12, 23, 24, 53
X	ALTMAN F P: "A METABOLIC DYSFUNCTION IN EARLY MURINE OSTEOARTHRITIS" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 40, 1981, pages 303-306, XP001023827 ISSN: 0003-4967 abstract page 305, column 2, paragraph 2 -page 306, column 1, paragraph 2; figure 2 ---	1-12, 25-31, 33, 36, 104
X	TANKA D ET AL: "ELECTRON TRANSPORTING ENZYMES OF RHEUMATOID CONNECTIVE TISSUE" ACTA MORPHOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE, vol. 25, no. 2-3, 1977, pages 137-146, XP001023838 E ISSN: 0001-6217 the whole document ---	1-12, 25-31, 33, 36, 104
X	TANKA D ET AL: "ROLE OF MITOCHONDRIAL ENZYMES IN THE PATHOMECHANISM OF RHEUMATOID ARTHRITIS" ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE, vol. 19, no. 1-2, 1984, page 116 XP001023933 ISSN: 0001-5253 the whole document ---	1-12, 25-31, 33, 36, 104
P, X	SAULEDA J ET AL: "THE ACTIVITY OF CYTOCHROME OXIDASE IS INCREASED IN CIRCULATING LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE, ASTHMA AND CHRONIC ARTHRITIS" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, US, vol. 161, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 32-35, XP001023839 ISSN: 1073-449X abstract ---	1-10, 25-31, 35, 36, 104

-/--

International Application No.
PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAGINSKI T J ET AL: "THE ROLE OF HYDROXYL RADICALS IN RODENT MODELS OF ARTHRITIS" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, vol. 11, no. 3, 1997, page A332 XP001016256 ISSN: 0892-6638 the whole document	1-10, 83-85, 87,104
X	MEYDANI M ET AL: "URINARY 8-OHdG AS A MARKER OF OXIDATIVE STRESS IN RHEUMATOID ARTHRITIS (RA) AND AGING: EFFECT OF PROGRESSIVE RESISTANCE TRAINING(PRT)" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, vol. 11, no. 3, 1997, page A377 XP001016257 ISSN: 0892-6638 the whole document	1-10, 83-85, 87,104
X	LUNEC J ET AL: "A MARKER OF OXIDATIVE DNA DAMAGE IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 348, no. 2, 1994, pages 131-138, XP001016255 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-10, 83-85, 87,104
X	CENCETTI A ET AL: "SUPEROXIDE ANION PRODUCTION BY CIRCULATING POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS" CLINICAL RHEUMATOLOGY, ACTA MEDICA BELGICA, BRUXELLES, BE, vol. 9, no. 1, 1990, pages 51-55, XP001023925 ISSN: 0770-3198 abstract	1-10, 83-85, 104
X	REDISKE J ET AL: "NITRIC OXIDE AND OSTEOARTHRITIS: PATHWAYS OF PROTEIN NITROSYLATION IN CHONDROCYTES" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 40, no. 9, SUPPL, September 1997 (1997-09), page S184 XP001023931 ISSN: 0004-3591 the whole document	1-10,83, 84,86, 104

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/25317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHAPMAN M L ET AL: "INCREASED CARBONYL CONTENT OF PROTEINS IN SYNOVIAL FLUID FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, TORONTO, CA, vol. 16, no. 1, 1989, pages 15-18, XP001023926 ISSN: 0315-162X the whole document	1-10, 83-85, 89,104
X	MIYATA T ET AL: "INCREASED PENTOSIDINE, AN ADVANCED GLYCATION END PRODUCT, IN PLASMA AND SYNOVIAL FLUID FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND ITS RELATION WITH INFLAMMATORY MARKERS" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 244, no. 1, 6 March 1998 (1998-03-06), pages 45-49, XP001023765 ISSN: 0006-291X abstract	1-10,83, 84,89, 104
A	BAYNES J W ET AL: "ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN DIABETIC COMPLICATIONS A NEW PERSPECTIVE ON AN OLD PARADIGM" DIABETES, NEW YORK, NY, US, vol. 48, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 1-9, XP001023927 ISSN: 0012-1797 the whole document	1-10, 83-89
X	HASSAN M Q ET AL: "PROTECTIVE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS AGAINST RHEUMATOID ARTHRITIS-INDUCED LIPID PEROXIDATION AND GLUTATHIONE DEPLETION" RESEARCH COMMUNICATIONS IN PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY, PJD PUBLICATIONS, WESTBURY, NY, US, vol. 3, no. 3/4, 1998, pages 105-113, XP001029924 ISSN: 1087-1101 the whole document	92,97, 101-103
X	KAPLAN R ET AL: "PROPRANOLOL AND THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 23, no. 2, February 1980 (1980-02), pages 253-255, XP001023936 ISSN: 0004-3591 the whole document	92,101, 102

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/25317

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CUSH J J ET AL: "US CONSENSUS GUIDELINES FOR THE USE OF CYCLOSPORIN A IN RHEUMATOID ARTHRITIS" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, TORONTO, CA, vol. 26, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 1176-1186, XP001023934 ISSN: 0315-162X the whole document	92,101, 102
X	RUSH G F ET AL: "THE MECHANISM OF ACUTE CYTOTOXICITY OF TRIETHYLPHOSPHINE GOLD(I) COMPLEXES II. TRIETHYLPHOSPHINE GOLD CHLORIDE-INDUCED ALTERATIONS IN MITOCHONDRIAL FUNCTION" TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA., US, vol. 90, no. 3, 1987, pages 391-400, XP001023935 abstract; figures 4-6; table 2	101
P,X	WO 99 55321 A (MITOKOR ;DAVIS ROBERT E (US); GHOSH SOUMITRA (US)) 4 November 1999 (1999-11-04) claims 1-12	92-103
P,X	WO 00 06150 A (AO FORSCHUNGSINST ;GERBER ISABEL (CH); SYNERGEN AG (CH); WALLIMANN) 10 February 2000 (2000-02-10) page 33, line 1 -page 37, line 14; claims 1,2	92,101, 102
A	US 4 870 210 A (MUSSEY JOHN H) 26 September 1989 (1989-09-26) abstract	92,101, 102
P,A	WILLER B ET AL: "EFFECTS OF CREATINE SUPPLEMENTATION ON MUSCLE WEAKNESS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS" RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 39, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 293-298, XP001023937 ISSN: 1462-0324 the whole document	92,101, 102
A	PRATTA M A ET AL: "EFFECT OF EBSELEN ON IL-1-INDUCED ALTERATIONS IN CARTILAGE METABOLISM" INFLAMMATION RESEARCH, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 47, no. 3, 1998, pages 115-121, XP000852928 ISSN: 1023-3830 abstract	92,97, 101-103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/US 00/25317
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 92-103 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.:
1-12 (partially), 15-21, 22 (partially), 23-53, 83-89, 92-103
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.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-12 (partially), 15 (partially), 16,
17-20 (partially), 22 (partially), 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the sample comprises a chondrocyte, the level of the indicator is compared in the presence and in the absence of transforming growth factor beta, and the indicator is nucleotide pyrophosphohydrolase, pyrophosphate or calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD).

2. Claims: 1-12 (partially), 15 (partially), 17 (partially),
22 (partially), 39-52, 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is ATP.

3. Claims: 1-12 (partially), 18-20 (partially), 21,
22 (partially), 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the sample comprises a chondrocyte, and the indicator is collagen.

4. Claims: 1-12 (partially), 18-20 (partially),
22 (partially), 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the sample comprises a chondrocyte, and the indicator is proteoglycan.

5. Claims: 1-12 (partially), 18-20 (partially),
22 (partially), 104 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the sample comprises a chondrocyte, and the indicator is calcium phosphate.

6. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 23-24, 53 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the level of the indicator is compared in the presence and in the absence of an inhibitor of mitochondrial function such as antimycin, oligomycin, rotenone and cyanide.

7. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 25-38, 53 (partially), 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is a mitochondrial electron transport chain enzyme.

8. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 54-56, 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is a mitochondrial inner membrane component.

9. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 57-65, 104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is a Krebs cycle enzyme.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 66-82,
104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is the mitochondrial mass per cell, the number of mitochondria per cell or the amount of mitochondrial DNA per cell.

11. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 83-89,
104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is free radical production, reactive oxygen species or products resulting therefrom.

12. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 90,
104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is a cellular response to elevated intracellular calcium.

13. Claims: 1-12 (partially), 22 (partially), 91,
104 (partially)

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the indicator is a cellular response to an apoptogen.

14. Claims: 92-103

Compositions for the treatment of arthritic disorders comprising agents influencing mitochondrial function.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

15. Claims: 105-112

Synthetic cartilage patches comprising chondrocytes selected or modified so as to have a given mitochondrial function, the chondrocytes being cultured in conditions permitting the elaboration of an extracellular matrix.

16. Claims: 1-11 (partially), 13-14

Methods of predicting, diagnosing, monitoring, classifying and identifying agents suitable for treating arthritic disorders in vertebrates by assessing the level of an indicator of altered mitochondrial function, wherein the sample comprises a hematopoietic cell.

page 4 of 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/25317

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5935796	A	10-08-1999	AU 696739 B2	17-09-1998
			AU 2873895 A	09-02-1996
			EP 0769025 A1	23-04-1997
			JP 10502807 T	17-03-1998
EP 0745850	A	04-12-1996	AU 705059 B2	13-05-1999
			AU 1717795 A	04-09-1995
			EP 0745850 A1	04-12-1996
			US 5948692 A	07-09-1999
			CA 2183589 A1	24-08-1995
			WO 9522765 A1	24-08-1995
WO 9955321	A	04-11-1999	AU 3965699 A	16-11-1999
			EP 1071414 A1	31-01-2001
			WO 9955321 A1	04-11-1999
			US 6268398 B1	31-07-2001
WO 0006150	A	10-02-2000	WO 0006150 A1	10-02-2000
			EP 1100488 A1	23-05-2001
US 4870210	A	26-09-1989	US 4889935 A	26-12-1989

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)
C 1 2 Q	1/26	C 1 2 Q	1/32
	1/32		1/34
	1/34		1/48
	1/48		1/527
	1/527		1/68
	1/68	G 0 1 N	33/15
G 0 1 N	33/15		33/50
	33/50		33/53
	33/53		33/566
	33/566	C 1 2 N	15/00
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	ゴーシュ, ソーミトラ エス. アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129, サン ディエゴ, パトス レーン 12334		
(72)発明者	デイビス, ロバート イー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サン ディエゴ, グレンクリフ ウェ イ 13272		
(72)発明者	グランストン, アンドリュー イー. ジュニア アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サン ディエゴ, カーメル ヴィスタ ロード 12229, アpartment 239		
(72)発明者	ターケルトーブ, ロバート アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サン ディエゴ, ディナラ ロード 13211		

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 DA12 DA13 DA14
FB02
4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 DA03
GA03 HA12
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ02
QQ08 QQ22 QQ24 QQ27 QQ32
QQ38 QQ63 QQ79 QR48 QR51
QR56 QR62 QS25 QS34
4C081 AB04 AB05 BA12 CD34
4C084 AA16 NA05 ZA962

专利名称(译)	用于诊断和治疗关节炎病症和用于调节骨量的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2003520575A	公开(公告)日	2003-07-08
申请号	JP2001523789	申请日	2000-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	Maitoko		
申请(专利权)人(译)	Maitoko		
[标]发明人	マーフィーアンエヌ ディケンズジェームズエイ ゴーシュソーミトラエス デイビスロバートイー グランストンアンドリュウイージュニア ターケルトーブロバート		
发明人	マーフィー, アン エヌ. ディケンズ, ジェームズ エイ. ゴーシュ, ソーミトラ エス. デイビス, ロバート イー. グランストン, アンドリュウ イー. ジュニア ターケルトーブ, ロバート		
IPC分类号	A61K45/00 A61L27/00 A61P19/02 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/32 C12Q1/34 C12Q1/48 C12Q1/527 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P19/02 G01N33/5088 G01N33/6887 G01N2333/4722 G01N2333/495 G01N2333/78 G01N2400/40 G01N2800/102 G01N2800/105		
FI分类号	A61K45/00 A61L27/00.G A61P19/02 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/32 C12Q1/34 C12Q1/48.Z C12Q1 /527 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024 /CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/GA03 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ22 4B063/QQ24 4B063/QQ27 4B063 /QQ32 4B063/QQ38 4B063/QQ63 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C081/AB04 4C081/AB05 4C081/BA12 4C081/CD34 4C084/AA16 4C084 /NA05 4C084/ZA962		
优先权	60/154145 1999-09-15 US 09/661848 2000-09-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了改进的诊断方法，用于通过比较线粒体功能改变的一种或多种指示剂的水平以及对关节炎的治疗，来早期检测人患关节炎的风险。在筛选测定中有用的治疗剂。线粒体功能改变的指标包括线粒体酶和诸如ATP生物合成因子之类的酶。线粒体功能改变的其他指标包括线粒体质量，线粒体数目和线粒体DNA含量，细胞内钙离子升高和细胞对凋亡诱导因子的反应以及自由基产生。还提供了治疗和分层人类患者的方法，例如那些涉及所揭示的线粒体功能改变的指标的方法。

