

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6081195号
(P6081195)

(45) 発行日 平成29年2月15日 (2017. 2. 15)

(24) 登録日 平成29年1月27日 (2017. 1. 27)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)
G O 1 N 33/574 (2006. 01)
G O 1 N 33/15 (2006. 01)
G O 1 N 33/50 (2006. 01)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A
 G O 1 N 33/574 A
 G O 1 N 33/15 Z
 G O 1 N 33/50 Z
 C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 22 (全 167 頁)

(21) 出願番号 特願2012-510951 (P2012-510951)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月11日 (2010. 5. 11)
 (65) 公表番号 特表2012-526555 (P2012-526555A)
 (43) 公表日 平成24年11月1日 (2012. 11. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/034427
 (87) 国際公開番号 W02010/132486
 (87) 国際公開日 平成22年11月18日 (2010. 11. 18)
 審査請求日 平成25年5月10日 (2013. 5. 10)
 (31) 優先権主張番号 61/177, 241
 (32) 優先日 平成21年5月11日 (2009. 5. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/177, 243
 (32) 優先日 平成21年5月11日 (2009. 5. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512235921
 バーグ エルエルシー
 アメリカ合衆国 3 7 2 1 0 テネシー州
 , ナッシュビル, エルム ヒル パイク
 1 8 4 5
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (74) 代理人 100169971
 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体がコエンザイム Q 1 0 反応性状態の腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価する方法であって：

(1) コエンザイム Q 1 0 で処置された腫瘍性障害を有する被験体から得られた生物試料中に存在する少なくとも 3 つのマーカーの発現レベルを決定すること、ここで、前記マーカーは、APAF1、BAX、カルモジュリン、CCT3、CTSD、GRB2、熱ショックタンパク質110、GRP78 Bip、IDH-1、好中球サイトゾル因子2、PDIA3、PECAM1、PRDX4、PSME3、RAB7、SOD3、およびSRXN1からなる群より選択される；

(2) 被験体から得られた生物試料中に存在する少なくとも 3 つのマーカーのそれぞれの発現レベルを対照試料中に存在する該マーカーの発現レベルと比較して 3 つ以上の比較結果を得ること

を含み、

ここで、

(A) 以下の場合：

(a) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、カルモジュリン、GRB2、熱ショックタンパク質110、GRP78 Bip、IDH-1、好中球サイトゾル因子2、およびPDIA3の少なくとも 1 つの増加が検出され、CCT3、CTSD、PRDX4、SOD3、およびSRXN1の少なくとも 2 つの低下が検出された場合；

(b) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、カルモジュリン、GRB2、熱ショックタン

10

20

パク質110、GRP78 Bip、IDH-1、好中球サイトゾル因子2、およびPDIA3の少なくとも2つの増加が検出され、CCT3、CTSD、PRDX4、SOD3、およびSRXN1の少なくとも1つの低下が検出された場合；

(c) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、カルモジュリン、GRB2、熱ショックタンパク質110、GRP78 Bip、IDH-1、好中球サイトゾル因子2、およびPDIA3の少なくとも3つの増加が検出された場合；あるいは

(d) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、CCT3、CTSD、PRDX4、SOD3、およびSRXN1の少なくとも3つの低下が検出された場合

に、前記被験体がコエンザイム Q 1 0 反応性状態の非転移性皮膚黒色腫に罹患している、
(B) 以下の場合： 10

(a) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、BAX、GRP78 Bip、およびIDH-1の少なくとも1つの増加が検出され、少なくともPSME3およびRAB7の低下が検出された場合；

(b) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、BAX、GRP78 Bip、およびIDH-1の少なくとも2つの増加が検出され、PSME3およびRAB7の少なくとも1つの低下が検出された場合；

(c) コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、少なくともBAX、GRP78 Bip、およびIDH-1の増加が検出された場合

に、前記被験体がコエンザイム Q 1 0 反応性状態の扁平上皮細胞癌腫に罹患している、
(C) 以下の場合： 20

コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、少なくともAPAF1、BAX、およびIDH-1の増加が検出された場合

に、前記被験体がコエンザイム Q 1 0 反応性状態の乳癌に罹患している、

(D) 以下の場合：

コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、少なくともIDH-1の増加が検出され、少なくともPECAM1の低下が検出された場合

に、前記被験体がコエンザイム Q 1 0 反応性状態の膵臓癌に罹患している、

(E) 以下の場合：

コエンザイム Q 1 0 の投与の結果として、少なくともIDH-1の増加が検出された場合
に、前記被験体がコエンザイム Q 1 0 反応性状態の肝臓癌に罹患している、前記方法。

【請求項 2】

試料は被験体から得られる流体を含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 3】

前記流体が、血液、嘔吐物、唾液、リンパ液、囊胞液、尿、気管支洗浄により収集された流体、腹腔洗浄により収集された流体、および婦人科学的流体からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

試料が血液試料またはその成分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

試料が被験体から得られた腫瘍組織またはその成分を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記被験体がヒトである、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 7】

生物試料中のマーカーの発現レベルは、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイすることによって決定される、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

転写されたポリヌクレオチドをアッセイすることは、転写されたポリヌクレオチドを増幅することを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

被験体試料におけるマーカーの発現レベルは、試料中でタンパク質またはその一部をア 50

ッセイすることによって決定される、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

タンパク質が、前記タンパク質に特異的に結合する試薬を使用してアッセイされる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試薬が標識されている、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試薬が、抗体および抗原結合性抗体フラグメントからなる群より選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

試料中のマーカーの発現レベルは、前記試料の、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅反応、逆転写酵素 PCR 分析、一本鎖コンホメーション多型分析（SSCP）、ミスマッチ切断検出、ヘテロ二重鎖分析、サザンブロット分析、ノーザンブロット分析、ウェスタンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション、アレイ分析、デオキシリボ核酸配列決定、制限フラグメント長多型分析、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される技術を使用して決定される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

試料中のマーカーの発現レベルが、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、ELISA、および質量分析からなる群より選択される技術を使用して決定される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも 10 のマーカーの発現レベルが決定される、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

被験体がコエンザイム Q10 反応性状態の腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価するためのキットであって、APAF1、BAX、カルモジュリン、CCT3、CTSD、GRB2、熱ショックタンパク質110、GRP78 Bip、IDH-1、好中球サイトゾル因子2、PDIA3、PECAM1、PRDX4、PSME3、RAB7、SOD3、およびSRXN1からなる群より選択される少なくとも 3 つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに前記被験体がコエンザイム Q10 反応性状態の腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価するためのキットの使用についての説明書を含む、

（A）前記腫瘍性障害が非転移性皮膚黒色腫であり、少なくとも 3 つのマーカーがカルモジュリン、GRB2、熱ショックタンパク質110、GRP78 Bip、IDH-1、好中球サイトゾル因子2、PDIA3、CCT3、CTSD、PRDX4、SOD3、およびSRXN1からなる群より選択される、

（B）前記腫瘍性障害が扁平上皮細胞癌腫であり、少なくとも 3 つのマーカーがBAX、GRP78 Bip、IDH-1、PSME3、およびRAB7からなる群より選択される、

（C）前記腫瘍性障害が乳癌であり、少なくとも 3 つのマーカーがAPAF1、BAX、およびIDH-1である、

（D）前記腫瘍性障害が膵臓癌であり、少なくとも 3 つのマーカーがIDH-1およびPECAM1を含む、

（E）前記腫瘍性障害が肝臓癌であり、少なくとも 3 つのマーカーがIDH-1を含む、前記キット。

【請求項 17】

コエンザイム Q10 で処置された腫瘍性障害を有する被験体から生物試料を入手するための手段をさらに含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

対照試料をさらに含む、請求項 16 または 17 に記載のキット。

【請求項 19】

少なくとも 3 つのマーカーの発現レベルを決定するための手段が、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイするための手段を含む、請求項 16～18 の

10

20

30

40

50

いずれか1項に記載のキット。

【請求項20】

少なくとも3つのマーカーの発現レベルを決定するための手段が、試料中のタンパク質またはその一部をアッセイするための手段を含む、請求項16～18のいずれか1項に記載のキット。

【請求項21】

コエンザイムQ10をさらに含む、請求項16～20のいずれか1項に記載のキット。

【請求項22】

少なくとも10のマーカーの発現レベルを決定するための試薬を含む、請求項16～21のいずれか1項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エピメタボリックシフター、多次元細胞内分子、または環境影響因子を使用する腫瘍性障害の診断のための方法に関する。

【0002】

関連出願

本出願は、“Methods for Treatment of Oncological Disorders Using an Epimetabolic Shifter (Coenzyme Q10)”という名称の2009年5月11日に出願された米国仮出願番号61/177,241（代理人整理番号：117732-00601）、“Methods for Treatment of Oncological Disorders Using Epimetabolic Shifters, Multidimensional Intracellular Molecules or Environmental Influencers”という名称の2009年5月11日に出願された米国仮出願番号61/177,243（代理人整理番号：117732-00701）、“Methods for the Diagnosis of Oncological Disorders Using Epimetabolic Shifters, Multidimensional Intracellular Molecules or Environmental Influencers”という名称の2009年5月11日に出願された米国仮出願番号61/177,244（代理人整理番号：117732-00801）、“Methods for Treatment of Metabolic Disorders Using Epimetabolic Shifters, Multidimensional Intracellular Molecules or Environmental Influencers”という名称の2009年5月11日に出願された米国仮出願番号61/177,245（代理人整理番号：117732-00901）、および“Methods for the Diagnosis of Metabolic Disorders Using Epimetabolic Shifters, Multidimensional Intracellular Molecules or Environmental Influencers”という名称の2009年5月11日に出願された米国仮出願番号61/177,246（代理人整理番号：117732-01001）の優先権を主張する。上述の各出願の内容全体は、参照により本明細書に組み入れられている。

【背景技術】

【0003】

癌は現在、先進国における主要な死亡原因の1つであり、現代社会にとって深刻な脅威である。癌はいずれの年齢のいずれの器官のいずれの組織においても発症する可能性がある。世界中で、毎年1000万人超が癌と診断され、この数は2020年までに毎年、新患1500万人に増加することが推定される。癌は世界中で毎年600万件または死亡の

10

20

30

40

50

12%を引き起こすと考えられる。

【0004】

癌の病因は明確には理解されていない。癌は、遺伝的感受性、染色体切断障害、ウイルス、環境因子および免疫障害を含む、長年の継続中の研究にわたる多くの因子に結び付けられてきた、または関連してきた。癌は、病状の大きなカテゴリを網羅する。癌細胞は、体のほぼいずれの器官および／または組織にでも発生する可能性がある。体の一部において細胞が制御不能な増殖または分化を開始するときに、癌が発症する。

【0005】

最近の研究は腫瘍形成の分子機構の多くの我々の理解を大いに向上させ、癌の処置に多数の新たな手段を提供してきたが、大半の悪性腫瘍の標準処置は完全摘出、化学療法、および放射線療法のままである。これらの各処置はますます成功しているが、多数の望ましくない副作用を引き起こし得る。例えば外科手術は疼痛、健常組織への外傷、および瘢痕化を生じ得る。放射線療法は癌細胞を死滅させる利点を有するが、同時に非癌性組織も損傷する。化学療法は、各種の抗癌薬の患者への投与を包含する。これらの標準処置は、有害な副作用、例えば悪心、免疫抑制、胃潰瘍および2次腫瘍形成を伴うことが多い。

【0006】

多くの個人および会社は長年にわたって、幅広い癌の処置での改善を求めて広範囲に及ぶ研究を実施してきた。会社は、癌のためのより有益な療法を提供することを望んで、化学的実体、例えば小型分子、および生物製剤、例えば抗体を含む生物活性剤を開発している。試験された生物活性剤には、一部の個人または癌の種類で作用して、有益な治療効果を提供したものもあれば、この試験プロトコルで失敗した、または最小の治療効果を有したものもあった。今日までに研究された他の生物活性剤は、完全に理解されていない作用機序を有する。

【0007】

本明細書でCoQ10、Q10、ユビキノン、またはユビデカレノンとも呼ばれるコエンザイムQ10は、普及している栄養補助食品であり、CoQ10の還元型であるユビキノールの抗酸化特性を通じて免疫系の保護を助けるビタミン様栄養補助食品として、カプセル剤形で栄養食品店、健康食品店、薬局などに見出すことができる。CoQ10は、当分野で認識されており、その全体の開示が参照により本明細書に組み入れられている、国際公開番号WO2005/069916にさらに記載されている。

【0008】

CoQ10は、人体の大半の組織および他の哺乳動物の組織のいたるところで見出される。ヒトにおけるCoQ10の組織分布および酸化還元状態は、Bhagavan HN, et al. による総説論文、Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetic, Free Radical Research 40(5), 445-453 (2006) (以下、Bhagavan, et al.) で総説されている。著者らは、「一般原則として、心臓、腎臓、肝臓および筋肉などのエネルギー要求または代謝活性の高い組織は、比較的高濃度のCoQ10を含有する」ことを報告している。著者らはさらに「脳および肺を除く組織中のCoQ10の大部分はヒドロキノンまたはユビキノール (ubiquinol) としての還元型であり、このことはこれらの2つの組織における酸化ストレスの上昇を反映するものと思われる」ことを報告している。特にBhagavan et al. は、心臓、腎臓、肝臓、筋肉、腸 (intestine) および血液 (血漿) において、CoQ10のそれぞれ約61%、75%、95%、65%、95%および96%が還元型であることも報告している。同様に、Ruiz-Jiminez, et al., Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress, J. Chroma A 1175(2), 242-248 (2007)

(以下、Ruiz-Jiminez, et al.) は、ヒト血漿がQ10およびQ10の還元型(Q10H2)について評価されたときに、分子の大部分(90%)が還元型で見出されたことを報告している。

【0009】

CoQ10は非常に親油性であり、大部分は水に不溶性である。水中でのその不溶性、脂質中での限られた溶解性、および比較的大きな分子量に起因して、経口投与されたCoQ10の吸収の効率は乏しい。Bhagavan, et al. は「ラットを用いた1つの研究において、経口投与されたCoQ10のわずか約2~3%が吸収されることが報告された」ことを報告している。Bhagavan, et al. はさらに「ラットの研究からのデータは、腸での吸収の間または後のどちらかに、CoQ10がユビキノールに還元されることを指摘している」ことを報告している。

10

【0010】

CoQ10は、文献において長年にわたって癌に関係してきた。文献で報告された関連の、いくつかの代表的ではあるが、完全に包括的というわけではない例が下に記載される。Karl Folkersら、Survival of Cancer Patients on Therapy with Coenzyme Q10, Biochemical and Biophysical Research Communication 192, 241-245 (1993) (本明細書中では以後、「Folkersら」) は、「CoQ10での治療に対する」癌患者の8つの症例の経過と、「5~15年間にわたる」彼らの生存率の経過(stories of survival)を記載している。CoQ10は、膵臓癌腫、腺癌、喉頭癌腫、乳癌、結腸癌、肺癌および前立腺癌を含む、異なる種類の癌を有する患者8名に経口投与された。Folkers, et al. は「これらの結果が今や、全身的プロトコルを正当化する」と述べている。Lockwood, et al., Progress on Therapy of Breast Cancer with Vitamin Q10 and the Regression of Metastases, Biochemical and Biophysical Research Communication 212, 172-177 (1995) (以下「Lockwood, et al.」) は、ビタミンQ10を用いた乳癌の療法の進歩について報告している別の総説論文である。Lockwood, et al. は、非腫瘍および腫瘍組織におけるビタミンQ10の可変レベルを明らかにした、動物およびヒトに対する35年間の国際的研究を扱い、腫瘍を有する処置マウスの中の生存マウスの増加に基づく宿主防御系に固有のビタミンQ10に関するデータを含む「Folkers, et al.」に言及している。Lockwood, et al. はさらに、乳癌症例における可変欠乏レベルを明らかにした、スウェーデンおよびアメリカの癌患者199名のCoQ10の血中レベルを決定した研究に依拠して、「ヒト癌のビタミンQ10療法の可能性が1961年に明白となった」ことを述べている。2002年7月9日に発行されたU. S. Patent No. 6, 417, 233 (以下Sears, et al.) は、ミトコンドリア病の予防および/または処置のための脂溶性ベンゾキノ、例えばコエンザイムQ10を含有する組成物について記載している。Sears, et al. は、「CoQ10処置が癌患者にいくつかの利益を提供することが報告されている(第2欄、30~31行を参照)」ことを述べている。

20

30

40

【0011】

本出願の出願日時点で、National Cancer Instituteは、癌処置におけるCoQ10の、多数の患者を包含する良好に設計臨床試験が行われていないのは、「研究が行われた方法および報告された情報の量によって、利益がコエンザイムQ10またはその他によって生じたのか否かが不明確にされたためである」ことを報告している。www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/coenzymeQ10/patient/allpages (2008年9月29日)で利用することができるNational Cancer Institute (NCI) を参照のこと。NCIは特に、乳癌患者における標準処置後のアジュバント療法としての

50

、数名の患者が処置によって助けられたように思われるC o Q 1 0の使用に関する3つの小規模な研究を引用し、「しかし、研究設計および報告の弱点によって、利益がコエンザイムQ 1 0またはその他によって生じたのか否かが不明確にされたためである」ことを繰返し述べている。N C Iは「これらの研究は以下の弱点を有した：研究はランダム化または制御されていなかった；患者はコエンザイムQ 1 0に加えて他の栄養補助食品を使用した；患者は、コエンザイムQ 1 0療法の前または間に標準処置を受けた；および詳細事項が研究のすべての患者に報告されていなかった」ことを明記している。N C Iはさらに「逸話的報告において、コエンザイムQ 1 0が膀胱癌、肺癌、結腸癌、直腸癌および前立腺癌を有する患者を含む、数名の癌患者がより長く生存するのを助けた」ことを報告しているが、「しかしこれらの報告で記載された患者は、化学療法、放射線療法および外科手術を含む、コエンザイムQ 1 0以外の他の処置も受けた」ことを示している。

10

【0012】

2006年2月16日に公開された米国特許公開番号2006/0035981（以下「Mazzio 2006」）は、宿主とは反対である、エネルギーを得るグルコースの非酸化的リン酸化のためのこの嫌氣的要件に関して癌の脆弱性を活用する組成物を使用して、ヒトおよび動物の癌を処置または予防する方法および製剤について記載している。Mazzio 2006の製剤は、酸化的代謝を相乗的に促進するおよび／または乳酸デヒドロゲナーゼもしくは嫌氣的グルコース代謝を妨げる1つ以上の化合物を含有して、さらに詳細には「2, 3-ジメトキシ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン（本明細書では「DMBQ」とも呼ばれる）（キノイドベース）ならびに対応するヒドロキノン、ユビクロメノール、ユビクロマノールまたは合成／天然誘導体および類似体を含む一連のユビキノン全体についての選択肢を含有すると記載されている。Mazzio 2006の3ページ、段落0010を参照。Mazzio 2006は、「抗癌剤としての短鎖ユビキノン（C o Q < 3）を確認し、「2, 3-ジメトキシ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン（DMBQ）が抗癌剤としてC o Q 1 0よりも1000倍を超えて強力であることをなおさらに確認している。Mazzio 2006の3ページ、段落0011を参照。Mazzio 2006はさらに、研究が「C o Q 1 0が予想されたほど致死性であることを見出さず」および「癌に対してC o Q 1 0を用いた同様の以前の研究が多少矛盾していた」ことを述べている。本記述を裏付ける引用の広範囲に及ぶリストについては、Mazzio 2006の3～4ページを参照。

20

30

【0013】

2007年10月25日に公開された米国特許公開番号2007/0248693（以下「Mazzio 2007」）はまた、癌を処置または予防する栄養補給組成物およびこの使用について記載している。再度、公開された本特許出願は、短鎖ユビキノンに焦点を合せており、本発明の不可欠な構成要素でないことを明確に述べている。Mazzio 2007によると、「C o Q 1 0は、癌細胞においてミトコンドリア複合体I I活性のVmaxを上昇させることができるが（Mazzio and Soliman, Biochem Pharmacol. 67:1167-84, 2004）、これは複合体I Vを通じてミトコンドリア呼吸またはO 2利用の速度を制御しなかった。そしてC o Q 1 0は、予想されたほど致死性ではなかった。同様に、癌に対するC o Q 1 0の結果が矛盾していた。」Mazzio 2007の5ページ、段落0019を参照。

40

【発明の概要】

【0014】

出願人らは以前に、動物被験体における腫瘍増殖速度を低下させるためのC o Q 1 0の局所製剤および方法について記載した（Hsia et al., 2005年8月4日に公開されたWO2005/069916）。Hsia et al.に記載された実験において、C o Q 1 0は皮膚癌細胞の培養物においてアポトーシス速度を上昇させたが、正常な細胞では上昇させなかったことが示された。その上、腫瘍担持動物のC o Q 1 0の局所製剤を用いた処置は、動物の腫瘍増殖速度を劇的に低下させることが示された。

【0015】

50

本発明は、少なくとも一部は、ヒトおよび／または細胞内でのC o Q 1 0の役割をより完璧に理解することに基づく。特に、本発明の方法および製剤は、少なくとも一部は、ヒト臨床試験を設計および実行することによってならびに／またはC o Q 1 0をヒト被験体に投与して、これらの試験および／または処置レジメンの間に出現する驚くべきおよび予想外の結果を観察することによって習得された、腫瘍性障害に対するC o Q 1 0の治療活性について得られた知識に基づいている。本発明の方法および製剤はさらに、少なくとも一部は、インビトロでの細胞のC o Q 1 0処置の広範囲に及ぶ研究から得られた、C o Q 1 0の治療機構への洞察に基づいている。

【0016】

少なくとも1つの実施形態において、本発明の方法および製剤は明確に、少なくとも一部は、コエンザイムQ 1 0（本明細書ではC o Q 1 0またはQ 1 0とも呼ばれる）の細胞への適用が、正常な細胞増殖に対する効果なしに、またはいくつかの場合において有効な効果と共に、癌細胞におけるアポトーシス応答の選択的誘導を生じるという驚くべき発見に基づいている。その上、少なくとも1つの追加の実施形態において、侵襲性癌から誘導された株化細胞は、より低い侵襲性癌または非侵襲性癌から誘導された株化細胞と比較して、C o Q 1 0に対して感受性である（例えば細胞傷害および／またはアポトーシスの誘導のために必要なC o Q 1 0の濃度がより低いおよび／または処置時間がより短い）ことが予想外に見出された。ミトコンドリアQ 1 0レベルの時間および用量応答が観察され、48時間後に細胞ミトコンドリア中のQ 1 0のレベルは6倍上昇した。少なくとも1つの追加の実施形態において、本発明はさらに、Q 1 0がいずれの著しい量でも供給された酸化型（酸化促進）で維持されて、Q 1 0 H 2の還元（抗酸化）型に変換されないという驚くべきおよび予想外の発見に基づいている。別の実施形態において、本発明はなおさらに、著しい数の遺伝子の発現が、酸化型のQ 1 0によって処置された細胞において調節されるという発見に基づいている。これらの調節されたタンパク質は、アポトーシス、癌生物学および細胞増殖、解糖および代謝、分子輸送、ならびに細胞シグナル伝達を含む、複数の細胞経路中に密集することが見出された。

【0017】

まとめると、本明細書に記載する結果は、Q 1 0の治療機構への洞察を提供した。例えば理論に拘束されることを望むものではないが、出願人の発見は、Q 1 0および特に、Q 1 0の酸化型が細胞微小環境への代謝シフトを誘導することを指摘している。癌細胞には示差的代謝が出現することが公知であり（ワーブルグ効果）、これにより大半の癌細胞は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（ピルビン酸塩の酸化）によってよりもむしろ、主にサイトゾルにおける解糖とこれに続く乳酸発酵によってエネルギーを産生する。出願人の発見は、Q 1 0が癌細胞の代謝状態を、グルコースの嫌気的使用からミトコンドリア酸化的リン酸化にシフトできることを指摘している。

【0018】

本明細書中で示される出願人らのデータに基づき、C o Q 1 0は、多次元細胞内分子（M I M）として、そしてエピメタボリックシフター（エピシフター）として同定されている。本発明は、M I M、エピシフター、およびそれらを使用することによる腫瘍性障害の診断または予後診断のための方法を提供する。

【0019】

したがって、特定の態様においては、本発明は、被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価する方法に関する。このような方法には、（1）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、上記マーカーは、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される）；ならびに、（2）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較すること（ここでは、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、被験体が腫瘍性障害に罹患していることの指標となる）が含まれ、それにより、被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかの評価される。

【0020】

特定の態様においては、本発明は、被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価する方法に関する。このような方法には、（１）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカーの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される）；ならびに、（２）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較すること（ここでは、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルの調節が、上記被験体が腫瘍性障害に罹患していることの指標となる）が含まれ、それにより、上記被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかの評価される。

10

【0021】

特定の態様においては、本発明は、被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかを予後診断する方法に関する。このような方法には、（１）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、上記マーカーは、表２～４および６～２９に列挙するマーカーからなる群より選択される）；ならびに、（２）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較すること（ここでは、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、上記被験体に腫瘍性障害を発症する素因があることの指標となる）が含まれ、それにより、被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかを予後診断される。

20

【0022】

特定の態様においては、本発明は、被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかを予後診断する方法に関する。このような方法には、（１）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカーの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される）；ならびに、（２）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、上記被験体に腫瘍性障害に罹患する素因があることの指標となり、それにより、被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかを予後診断される。

30

【0023】

特定の態様においては、本発明は、被験体における腫瘍性障害の再発を予後診断する方法に関する。このような方法には、（１）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、上記マーカーは、表２～４および６～２９に列挙するマーカーからなる群より選択される）；ならびに、（２）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、腫瘍性障害の再発の指標となり、それにより、被験体における腫瘍性障害の再発が予後診断される。

40

【0024】

特定の態様においては、本発明は、被験体における腫瘍性障害の再発を予後診断する方法に関する。このような方法には、（１）被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカーの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される）；ならびに、（２）被験体から得られた生物試料中に存在する

50

マーカの発現レベルを対照試料中に存在するマーカの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカの発現レベルにおける調節が、腫瘍性障害の再発の指標となり、それにより、被験体における腫瘍性障害の再発が予後診断される。

【0025】

特定の態様においては、本発明は、腫瘍性障害を持つ被験体の生存を予後診断する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを決定すること(ここでは、上記マーカは、表2～4および6～29に列挙するマーカからなる群より選択される)；ならびに、(2) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを対照試料中に存在するマーカの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカの発現レベルにおける調節が、被験体の生存の指標となり、それにより、腫瘍性障害を持つ被験体の生存が予後診断される。

10

【0026】

特定の態様においては、本発明は、腫瘍性障害を持つ被験体の生存を予後診断する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを決定すること(ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される)；ならびに、(2) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを対照試料中に存在するマーカの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカの発現レベルにおける調節が、被験体の生存の指標となり、それにより、腫瘍性障害を持つ被験体の生存が予後診断される。

20

【0027】

特定の態様においては、本発明は、被験体において腫瘍性障害の侵襲性を予後診断する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを決定すること(ここでは、上記マーカは、表2～4および6～29に列挙するマーカからなる群より選択される)；ならびに、(2) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを対照試料中に存在するマーカの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカの発現レベルにおける調節が、上記腫瘍性障害が侵襲性であることの指標となり、それにより、被験体の腫瘍性障害の侵襲性が予後診断される。

30

【0028】

特定の態様においては、本発明は、被験体において腫瘍性障害の侵襲性を予後診断する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを決定すること(ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される)；ならびに、(2) 被験体から得られた生物試料中に存在するマーカの発現レベルを対照試料中に存在するマーカの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカの発現レベルにおける調節が、上記腫瘍性障害が侵襲性であることの指標となり、それにより、被験体の腫瘍性障害の侵襲性が予後診断される。

40

【0029】

特定の態様においては、本発明は、被験体において腫瘍性障害の進行を監視する(モニターする)方法に関する。このような方法には、被験体への処置レジメンの少なくとも一部の投与(施用)の前に上記被験体から得られた第1の試料中に存在するマーカの発現レベルと、処置レジメンの少なくとも一部の投与(施用)後に上記被験体から得られた第2の

50

試料中に存在するマーカーの発現レベルを比較すること（ここでは、上記マーカーは、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される）が含まれ、それにより、被験体における腫瘍性障害の進行が監視される。

【0030】

特定の態様においては、本発明は、被験体において腫瘍性障害の進行を監視する方法に関する。このような方法には、被験体への処置レジメンの少なくとも一部の投与の前に上記被験体から得られた第1の試料中に存在するマーカーの発現レベルと、処置レジメンの少なくとも一部の投与後に上記被験体から得られた第2の試料中に存在するマーカーの発現レベルを比較すること（ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカーの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される）が含まれ、それにより、被験体における腫瘍性障害の進行が監視される。

10

【0031】

特定の態様においては、本発明は、被験体の腫瘍性障害の処置についての治療の有効性を評価するための方法に関する。このような方法には、被験体への処置レジメンの少なくとも一部の投与の前に上記被験体から得られた第1の試料中に存在するマーカーの発現レベル（ここでは、上記マーカーは、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される）と、処置レジメンの少なくとも一部の投与後に上記被験体から得られた第2の試料中に存在するマーカーの発現レベルを比較することが含まれ、ここでは、第1の試料と比較した第2の試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、上記治療が被験体の腫瘍性障害の処置に有効であることの指標となる。

20

【0032】

特定の態様においては、本発明は、被験体の腫瘍性障害の処置についての治療の有効性を評価するための方法に関する。このような方法には、被験体への処置レジメンの少なくとも一部の投与の前に上記被験体から得られた第1の試料中に存在するマーカーの発現レベル（ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカーの発現が、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように調節される）と、処置レジメンの少なくとも一部の投与後に上記被験体から得られた第2の試料中に存在するマーカーの発現レベルを比較することが含まれ、ここでは、第1の試料と比較した第2の試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、上記治療が被験体の腫瘍性障害の処置に有効であることの指標となる。

30

【0033】

特定の態様においては、本発明は、それが必要な被験体における腫瘍性障害の処置について環境影響因子化合物の有効性を評価する方法に関する。このような方法には、（1）正の倍率変化および／または負の倍率変化を有している、被験体から得られた生物試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、上記生物試料は、環境影響因子化合物に曝されており、そして上記マーカーは、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される）；（2）被験体から得られた第2の生物試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルを決定すること（ここでは、上記試料は、環境影響因子化合物に曝されていない）；ならびに、（3）環境影響因子化合物に曝された生物試料中での1つまたは複数のマーカーの発現レベルと、環境影響因子化合物に曝されていない生物試料中での1つまたは複数のマーカーの発現レベルを比較することが含まれ、ここでは、第2の試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルと比較した、環境影響因子化合物に曝された生物試料中に存在する負の倍率変化を有する1つまたは複数のマーカーの発現レベルの低下が、上記環境影響因子化合物が腫瘍性障害を有している被験体の腫瘍性障害の処置に有効であることの指標となり、第2の試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルと比較した、環境影響因子化合物に曝された生物試料中に存在する正の倍率変化を有する1つまたは複数のマーカーの発

40

50

現レベルの増大が、上記環境影響因子化合物が腫瘍性障害を有している被験体において腫瘍性障害の処置に有効であることの指標となり、それにより、腫瘍性障害を有している被験体において腫瘍性障害を処置することについての上記環境影響因子化合物の有効性が評価される。

【0034】

特定の態様においては、本発明は、それが必要な被験体における腫瘍性障害の処置について環境影響因子化合物の有効性を評価する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から得られた生物試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルを決定すること(ここでは、上記生物試料は環境影響因子化合物に曝されており、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中では、マーカーの発現は、正常な生理学的条件下にある被験体の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように上方調節または下方調節される)；(2) 被験体から得られた第2の生物試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルを決定すること(ここでは、上記試料は、環境影響因子化合物に曝されていない)；ならびに、(3) 環境影響因子化合物に曝された生物試料中での1つまたは複数のマーカーの発現レベルと、環境影響因子化合物に曝されていない生物試料中での1つまたは複数のマーカーの発現レベルを比較することが含まれ、ここでは、前記環境影響因子化合物に曝された生物試料中での、第2の試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルと比較した1つまたは複数の下方調節されたマーカーの発現レベルの低下が、上記環境影響因子化合物が腫瘍性障害を有している被験体の腫瘍性障害の処置に有効であることの指標となり、前記環境影響因子化合物に曝された生物試料中での、第2の試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルと比較した1つまたは複数の上方調節されたマーカーの発現レベルの増大が、上記環境影響因子化合物が腫瘍性障害を有している被験体において腫瘍性障害の処置に有効であることの指標となり、それにより、腫瘍性障害を有している被験体において腫瘍性障害を処置することについての上記環境影響因子化合物の有効性が評価される。

【0035】

特定の態様においては、本発明は、被験体の腫瘍性障害を処置するための化合物を同定する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から生物試料を得ること；(2) 上記生物試料を試験化合物と接触させること；(3) 上記被験体から得られた生物試料中に存在する、正の倍率変化および／または負の倍率変化を有している1つまたは複数のマーカーの発現レベルを決定すること(ここでは、上記マーカーは、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される)；(4) 生物試料中の1つまたは複数のマーカーの発現レベルを試験化合物と接触させなかった対照試料と比較すること；ならびに、(5) 生物試料中に存在する負の倍率変化を有している1つまたは複数のマーカーの発現レベルを低下させる試験化合物、および／あるいは生物試料中に存在する正の倍率変化を有している1つまたは複数のマーカーの発現レベルを増大させる試験化合物を選択することが含まれ、それにより、被験体の腫瘍性障害を処置するための化合物が同定される。

【0036】

特定の態様においては、本発明は、被験体の腫瘍性障害を処置するための化合物を同定する方法に関する。このような方法には、(1) 被験体から生物試料を得ること；(2) 上記生物試料を試験化合物と接触させること；(3) 上記被験体から得られた生物試料中に存在する1つまたは複数のマーカーの発現レベルを決定すること(ここでは、細胞代謝エネルギーが解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化にシフトするように誘導された腫瘍性障害の癌性細胞中で、上記マーカーの発現が上方調節されているかまたは下方調節されている)；(4) 生物試料中の1つまたは複数のマーカーの発現レベルを試験化合物と接触させなかった対照試料と比較すること；ならびに、(5) 上記生物試料中で1つまたは複数の下方調節されたマーカーの発現レベルを低下させる、および／あるいは上記生物試料中で1つまたは複数の上方調節されたマーカーの発現レベルを増大させる試験化合物

を選択することが含まれ、それにより、被験体の腫瘍性障害を処置するための化合物が同定される。

【0037】

特定の実施形態においては、解糖という用語には状況に応じて、付随する乳酸塩の生成が含まれる。

【0038】

いくつかの実施形態においては、腫瘍性障害は、白血病、リンパ腫、黒色腫、癌腫、および肉腫からなる群より選択される腫瘍性障害である。

【0039】

いくつかの実施形態においては、マーカー（単数または複数）は、哺乳動物の癌性細胞中で、解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化への細胞代謝エネルギーのシフトを、哺乳動物の正常な生理学的条件下にある哺乳動物の正常な細胞中で観察されるレベルに向かうように選択的に誘発する。

10

【0040】

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

20

【0041】

ある実施形態において、被験体はヒトである。

【0042】

ある実施形態において、生物試料中のマーカーの発現のレベルは、試料中の転写されたポリヌクレオチドまたはその一部をアッセイすることによって決定される。ある実施形態において、転写されたポリヌクレオチドをアッセイすることは、転写されたポリヌクレオチドを増幅することを含む。ある実施形態において、被験体試料におけるマーカー発現のレベルは、試料中でタンパク質またはその一部をアッセイすることによって決定される。いくつかの実施形態においては、タンパク質は、そのタンパク質と特異的に結合する試薬（例えば、標識試薬）を使用してアッセイされる。試薬には、例えば、抗体および抗原結合抗体フラグメントが含まれてもよい。

30

【0043】

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

40

【0044】

ある実施形態において、マーカーは、HNF4アルファ、Bcl-x1、Bcl-xS、BNIP-2、Bcl-2、Bircl6、Bcl-2-L11（Bim）、XIAP、BRAF、Bax、c-Jun、Bmf、PUMA、cMyc、トランスアルドラーゼ1、COQ1、COQ3、COQ6、プレニルトランスフェラーゼ、4-ヒドロベンゾエート、好中球サイトゾル因子2、1酸化窒素シンターゼ2A、スーパーオキシドディスムターゼ2、VDAC、Baxチャネル、ANT、シトクロムc、複合体1、複合体II、複合体III、複合体IV、Foxo3a、DJ-1、IDH-1、Cpt1CおよびカムキナーゼIIからなる群より選択されるマーカーである。ある実施形態において、マーカーはアポトーシスと関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは酸化ス

50

トレスと関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは熱ショックと関連するマーカーである。ある実施形態において、マーカーは血管新生と関連するマーカーである。ある実施形態において、複数のマーカーの発現レベルが決定される。

【0045】

いくつかの実施形態においては、被験体は、環境影響因子化合物、外科手術、放射線治療、ホルモン療法、抗体療法、成長因子を用いた治療、サイトカイン、および化学療法から選択される治療で処置されている。ある実施形態において、治療は、環境影響因子化合物を含む。環境影響因子化合物は、例えば、多次元細胞内分子(MIM)またはエピメタボリックシフター(エピシフター)であり得る。ある実施形態において、環境影響因子化合物はC o Q 1 0である。ある実施形態において、環境影響因子化合物はビタミンD 3である。ある実施形態において、環境影響因子化合物は、アセチルC o A、パルミチル、L-カルニチン、チロシン、フェニルアラニン、システイン、および小分子から選択される化合物である。ある実施形態において、環境影響因子化合物はフィブロネクチン、TNFアルファ、IL-5、IL-12、IL-23、血管新生因子、およびアポトーシス因子から選択される化合物である。いくつかの実施形態においては、治療にはさらに、外科手術、放射線治療、ホルモン療法、抗体療法、成長因子を用いた治療、サイトカイン、および化学療法から選択される処置レジメンが含まれる。

10

【0046】

特定の態様において、本発明は、被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかを評価するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

20

【0047】

特定の態様において、本発明は、被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかを予後診断するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかを予後診断するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

【0048】

特定の態様において、本発明は、被験体において腫瘍性障害の再発を予後診断するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを評価するための試薬、ならびに腫瘍性障害の再発を予後診断するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

30

【0049】

特定の態様において、本発明は、腫瘍性障害の再発を予後診断するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに腫瘍性障害の再発を予後診断するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

40

【0050】

特定の態様において、本発明は、腫瘍性障害を持つ被験体の生存を予後診断するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに腫瘍性障害を持つ被験体の生存を予後診断するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

【0051】

特定の態様においては、本発明は、被験体の腫瘍性障害の侵襲性を予後診断するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、

50

ならびに被験体の腫瘍性障害の侵襲性を予後診断するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

【0052】

特定の態様において、本発明は、被験体において腫瘍性障害の進行を監視するためにキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに被験体において腫瘍性障害の進行を予後診断するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

【0053】

特定の態様において、本発明は、腫瘍性障害の処置についての治療の有効性を評価するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに腫瘍性障害の処置についての治療の有効性を評価するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

10

【0054】

特定の態様において、本発明は、腫瘍性障害を有している被験体において、腫瘍性障害の処置についての環境影響因子化合物の有効性を評価するためのキットに関する。このようなキットには、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現レベルを決定するための試薬、ならびに腫瘍性障害を有している被験体において、腫瘍性障害の処置についての環境影響因子化合物の有効性を評価するためのキットの使用についての説明書が含まれる。

20

【0055】

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

【0056】

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

30

【0057】

特定の態様において、本発明は、被験体がC o Q 1 0 反応性状態に罹患しているか否かを評価する方法に向けられる。このような方法には、(1)被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを決定すること(ここでは、上記マーカーは、表2～4および6～29に列挙するマーカーからなる群より選択される)；ならびに、(2)被験体から得られた生物試料中に存在するマーカーの発現レベルを対照試料中に存在するマーカーの発現レベルと比較することが含まれ、ここでは、対照試料中のマーカーの発現レベルと比較した被験体から得られた生物試料中のマーカーの発現レベルにおける調節が、被験体がC o Q 1 0 反応性状態に罹患していることの指標となり、それにより、被験体がC o Q 1 0 反応性状態に罹患しているかどうかの評価される。いくつかの実施形態においては、C o Q 1 0 反応性状態は腫瘍性障害である。

40

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、24時間のQ 1 0 処置に対するS K - M E L - 2 8 の感受性。

【図2】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、24時間のQ 1 0 処置に対するS K B R 3 の感受性。

【図3】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、24時間のQ 1 0 処置に対するP a C a 2 の感受性。

50

【図4】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、24時間のQ10処置に対するPC-3の感受性。

【図5】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、24時間のQ10処置に対するHepG2の感受性。

【図6】早期および後期アポトーシス細胞の量によって測定された、24時間のQ10処置に対するMCF-7の感受性。

【図7】アポストランドELISA法によって測定されたような、Q10による24時間処置時のアポトーシス細胞の測定。

【図8】2次元ゲル電気泳動のゲル分析例。同定のために切除されたスポットがマーキングされている。

10

【図9】SK-MEL-28細胞中でQ10によって調節されているような、2次元ゲル電気泳動によって同定されたタンパク質間の相互作用のネットワーク。

【図10】Verhoeven et al. (Am. J. Hum. Genet. 2001 68 (5): 1086-1092) から転載された、ペントースリン酸経路。

【図11】SK-MEL-28細胞のミトコンドリア高濃度物質の2次元ゲル。切除され、質量分析キャラクタリゼーションによって同定されたスポットがマーキングされている。

【図12】培養培地中への100 μM Q10の外部からの添加後の、SK-MEL-28ミトコンドリアに存在するQ10の相対量の比較プロット。

【図13A】公知のプロセスのアポトーシス経路マッピング。

20

【図13B】図13Aの続きである。

【図14】Bcl-x1のウェスタンブロット分析。

【図15】ビメンチン抗体によって証明されたSK-MEL-28試料セットのウェスタンブロット分析。

【図16】酸化リン酸化複合体(MitoSciences番号MS601)をターゲットにする5種類の抗体によって評価されたいくつかの株化細胞からの細胞溶解のウェスタンブロット分析。

【図17】F1-アルファレベルのウェスタンブロット比較。

【図18】C-I I I -Core2とのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図19】C-I I -30とのQ10応答のウェスタンブロット比較。

30

【図20】C-I V -COX I I とのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図21】C-I -20 (ND6) とのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図22】5種類のミトコンドリアタンパク質に対する多種多様の細胞タイプのウェスタンブロット分析。

【図23】複合体Vタンパク質C-V-αとのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図24】C-I I I -Core1とのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図25】ポリン(VDAC1)とのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図26】シクロフィリンDとのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図27】シトクロムCとのQ10応答のウェスタンブロット比較。

【図28】Helix 10オープン立体配座のHNF4アルファ(1M7W, pdb)の脂質結合チャンネルに挿入されたQ10(球)の理論モデル。

40

【図29】正常酸素条件および低酸素条件での各種のグルコース条件におけるHDFa細胞のOCR。

【図30】正常酸素条件および低酸素条件での各種のグルコース条件におけるHASMC細胞のOCR。

【図31】CoQ10とストレス因子の存在下および非存在下での、MCF-7乳癌細胞中のOCR値。

【図32】CoQ10とストレス因子の存在下および非存在下での、PaCa-2膵臓癌細胞中のOCR値。

【発明を実施するための形態】

50

【0059】

定義

本明細書で使用する場合、以下の用語のそれぞれが、本セクションにおける用語と関連する意味を有する。

【0060】

冠詞「a」および「an」は、冠詞の文法的対象のうち1つまたは1つを超える（すなわち少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。1例として、「要素」は、1つの要素または1つを超える要素を意味する。

【0061】

「含む（including）」という用語は、「限定されるわけではないが、含む」という句を意味するために本明細書で使用され、「限定されるわけではないが、含む」と互換的に使用される。

10

【0062】

「または」という用語は、状況が別途明らかに指摘しない限り、「および／または」という用語を意味するために本明細書で使用され、「および／または」という用語と互換的に使用される。

【0063】

「などの」という用語は、「限定されるわけではないが、などの」という句を意味するために本明細書で使用され、「限定されるわけではないが、などの」と互換的に使用される。

20

【0064】

本発明の方法によって処置される「患者」または「被験体」は、ヒトまたは非ヒト動物のどちらか、好ましくは哺乳動物を意味することができる。本明細書で使用される場合、「被験体」または「患者」は、非限定的に、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ハムスター、サル、モルモット、ラット、マウス、トカゲ、ヘビ、ヒツジ、ウシ、魚類、および鳥類を含む任意の動物（例えば、ヒト）を含む。

【0065】

本明細書中で使用される場合は、「生存」は、腫瘍性障害について処置された被験体の生命の継続を意味する。1つの実施形態においては、生存は、腫瘍性障害の再発がないことをいう。

30

【0066】

本明細書中で使用される場合は、用語「再発する」または「再発」は、腫瘍についての最初の処置が投与された被験体における腫瘍または癌性細胞の再増殖をいう。腫瘍は、もとの部位で起こる場合も、また体の別の部分において起こる場合もある。1つの実施形態においては、再発する腫瘍は、それについて被験体が処置されたもとの腫瘍と同じタイプの腫瘍である。例えば、被験体が脾臓腫瘍を有しており、処置され、その後に別の脾臓腫瘍を発症した場合は、腫瘍は再発している。加えて、腫瘍性障害は、それが最初に生じた場所以外の異なる臓器または組織に再発し得る。例えば、被験体が脾臓腫瘍を有しており、処置され、その後に肝臓腫瘍を発症した場合は、この腫瘍もまた再発している。

【0067】

本明細書中で使用される場合は、腫瘍性障害に関する用語「侵襲性」は、被験体において再発する素因を有している腫瘍、またはそのような侵襲性腫瘍に由来する細胞をいう。

40

【0068】

本明細書で使用される場合、「量」という用語は、（a）分子中で測定されるような絶対量、モル、または単位体積もしくは細胞あたりの重量、あるいは（b）例えば、0～5までの数字による順位づけによって指定されるような相対量のいずれかをいう。

【0069】

用語「対照量」は、本明細書中で使用される場合は、腫瘍性障害に罹患していない被験体に由来する細胞または試料、侵襲性腫瘍に由来する細胞または試料、あるいは非侵襲性腫瘍に由来する細胞または試料中のマーカーの量をいう。「対照量」は、例えば、マーカー

50

ーを発現する、例えば、高レベルで、中程度のレベルで、および低レベルでこれらのタンパク質を発現することが知られている細胞または組織に存在するマーカーの平均量を計算することによって決定されてもよい。

【0070】

「治療の有効量」は、疾患を処置するために患者に投与されたときに疾患に対してこのような処置をもたらすのに十分である化合物の量を意味する。疾患を予防するために投与されたときに、量は、疾患の開始を回避または遅延するのに十分である。「治療の有効量」は、化合物、疾患およびその重症度ならびに処置される患者の年齢、体重などに応じて変動するであろう。

【0071】

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

【0072】

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

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

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

【0076】

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

【0077】

「より高レベルの発現」、「より高レベルの活性」、「発現レベルの増加」、または「活性レベルの増加」とは、発現および／または活性を評価するために利用されるアッセイの標準誤差よりも大きく、かつ好ましくは、対照試料（例えば、発癌性障害に罹患していない健常被験体からの試料）におけるマーカーの発現レベルおよび／または活性、好まし

10

20

30

40

50

くは、いくつかの対照試料におけるマーカーの平均発現レベルおよび／または活性の少なくとも2倍、より好ましくは3倍、4倍、5倍、または10倍以上である、試験試料中の発現レベルおよび／または活性をいう。

【0078】

「より低レベルの発現」、「より低レベルの活性」、「発現レベルの減少」、または「活性レベルの減少」とは、発現および／または活性を評価するために利用されるアッセイの標準誤差よりも大きい、しかし好ましくは、対照試料（例えば、マーカーの予後診断能力のための妥当性標準として働くフォローアップ情報を有する腫瘍学的障害のパネルに対して直接的または間接的に較正されている試料）におけるマーカーの発現レベルおよび／または活性、好ましくは、いくつかの対照試料におけるマーカーの平均発現レベルおよび／または活性の少なくとも1/2倍、より好ましくは1/3倍、1/4倍、1/5倍、または1/10倍である、試験試料中の発現レベルおよび／または活性をいう。

10

【0079】

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

【0080】

本明細書中で使用される場合は、「公知の基準」または「対照」は、適用できる限りは、本発明のマーカーに関する1つまたは複数の量および／あるいは数学的関係、ならびに腫瘍性障害の有無をいう。公知の基準は、再発腫瘍および非再発腫瘍および／または侵襲性もしくは非侵襲性腫瘍に特徴的なそのような量ならびに／あるいは数学的関係を反映することが好ましい。公知の基準を作製するための試薬としては、侵襲性であることが既知である腫瘍由来の腫瘍細胞、非侵襲性であることが既知である腫瘍由来の腫瘍細胞、および状況に応じて標識された抗体が挙げられるがこれらに限定されない。公知の基準にはまた、組織培養細胞株（特異的なマーカータンパク質を発現するように、もしくは特異的なマーカータンパク質を発現しないように操作された細胞株を含むがこれらに限定されない）、または一定量のマーカータンパク質を構成的に含むか、もしくはマーカータンパク質を発現するように、（例えば、変化した環境（ここではそのような変化した環境には、成長因子、ホルモン、ステロイド、サイトカイン、抗体、様々な薬物、および代謝拮抗薬、ならびに細胞外マトリックスが含まれ得るが、これらに限定されない）への暴露により）操作することができるかのいずれかである腫瘍異種移植片も含まれ得る。細胞系統は、分析のためにガラススライド上に直接的に装着され、固定され、ペレットとして直接的にパラフィンに包埋され、またはアガロースなどのマトリックスに懸濁され、次いで固定され、パラフィンに包埋され、切片化され、そして組織試料として処理されてもよい。基準は、マーカータンパク質の予後診断能力の検証基準となる追跡情報を用いて、消化管癌または乳癌のパネルに対して直接あるいは間接的に較正されなければならない。

20

30

【0081】

「最初の処置」は、本明細書中で使用する場合は、腫瘍性障害に罹患している被験体の最初の処置をいう。最初の処置としては、外科手術、放射線治療、ホルモン療法、化学療法、免疫療法、血管形成療法、および生体調節因子による治療が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0082】

腫瘍性障害は、腫瘍性障害の少なくとも1つの症候が、軽減される、終わる、遅くなる、または予防されると期待されるか、あるいは軽減される、終わる、遅くなる、または予防される場合に、「処置される」。本明細書中で使用される場合は、腫瘍性障害はまた、腫瘍性障害の再発または転移が少なくなる、遅くなる、遅らせられる、または予防される場合に、「処置される」。

【0083】

50

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

【0084】

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

【0085】

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

10

【0086】

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

【0087】

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

20

【0088】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物、例えば本明細書に記載するMIMまたはエピシフターは、それを必要とする被験体においてコエンザイムQ10反応性状態を処置するために使用される。言語「コエンザイムQ10反応性状態」または「CoQ10反応性状態」には、コエンザイムQ10の投与により処置する、予防する、または別の意味で緩和することができる疾患、障害、状態、および／または症状が含まれる。いずれかの特定の理論によって拘束されることを望むものではなく、本明細書でさらに記載されるように、細胞微小環境への代謝シフト、例えば正常状態細胞における酸化的リン酸化の種類および／またはレベルに向けたシフトを誘導することによって、少なくとも部分的に機能することが考えられる。したがって、いくつかの実施形態において、CoQ10反応性状態は、細胞微小環境の代謝の改変から生じる状態である。コエンザイムQ10反応性状態は、例えば解糖および乳酸塩生合成に向かって偏り得る、例えば腫瘍性障害を含む。いくつかの実施形態において、CoQ10反応性腫瘍性障害は数ある中でも、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、または骨癌、扁平上皮細胞癌腫、基底細胞癌腫、黒色腫、および光線性角化症を含む。コエンザイムQ10反応性状態は、本明細書に記載するような他の腫瘍性障害をさらに含む。

30

40

【0089】

コエンザイムQ10反応性状態は、例えば肥満、糖尿病、糖尿病前症、メタボリックシンドローム、満腹、および内分泌異常などの代謝性障害も含む。コエンザイムQ10反応性状態は、本明細書に記載するような他の代謝性障害をさらに含む。

【0090】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物、例えば本明細書に記載するMIMまたはエピシフターは、コエンザイムQ10と共通の活性を共有する。本明細書で使用する場合、「コエンザイムQ10と共通の活性を共有する」という句は、化合物がコエンザイムQ10と同じまたは類似の活性の少なくとも一部を呈する能力を指す。いくつかの実施形

50

態において、本発明の化合物は、コエンザイムQ10の活性の25%またはそれ以上を呈する。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムQ10の活性の最大約130%（130%を含む）を呈する。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムQ10の活性の約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%、110%、111%、112%、113%、114%、115%、116%、117%、118%、119%、120%、121%、122%、123%、124%、125%、126%、127%、128%、129%、または130%を呈する。本段落に挙げられた各値が「約」という用語によって修飾され得ることが理解される。加えて、本段落に挙げられたいずれの2つの値によって定義されたいずれの範囲も、本発明に含まれることを意味することが理解される。例えばいくつかの実施形態において、本発明の化合物は、コエンザイムQ10の活性の約50%～約100%を呈する。いくつかの実施形態において、コエンザイムQ10および本発明の化合物によって共有される活性は、細胞代謝におけるシフトを誘導する能力である。ある実施形態において、CoQ10および本発明の化合物はによって共有される活性は、OCR（酸素消費速度）および／またはECAR（細胞外酸性化速度）によって測定される。

10

20

【0091】

本明細書で使用する場合、「腫瘍性障害」は、限定されるわけではないが：白血病、リンパ腫、黒色腫、癌腫および肉腫を含む、ヒトに見出されるあらゆる種類の癌または新生物または悪性腫瘍を指す。本明細書で使用する場合、「腫瘍性障害」、「癌」、「新生物」、および「腫瘍」という用語または専門語は、互換的におよび単数形または複数形のどちらかで使用され、これらを宿主生物に対して病的にする悪性形質転換を受けた細胞を指す。いくつかの実施形態において、腫瘍性障害はコエンザイムQ10反応性状態である。

30

【0092】

いくつかの実施形態において、腫瘍性障害または癌は、アポトーシスの欠如によって特徴付けられる。他の実施形態において、腫瘍性障害または癌は、血管形成の増加によって特徴付けられる。他の実施形態において、腫瘍性障害または癌は、細胞外マトリックス（ECM）の分解によって特徴付けられる。また他の実施形態において、腫瘍性障害または癌は、細胞周期制御の消失によって特徴付けられる。なお他の実施形態において、腫瘍性障害または癌は、ミトコンドリア酸化的リン酸化から乳酸塩および解糖流量に対する利用および／または依存性の向上への代謝管理のシフトによって特徴付けられる。さらなる実施形態においては、腫瘍性障害または癌は、免疫監視を逃れる免疫調節機構を獲得したことを特徴とする。1実施形態において、腫瘍性障害または癌は、上の特色の少なくとも2つ、例えば血管形成の増加またはECMの分解によって特徴付けられる。1実施形態において、腫瘍性障害または癌は、上の特色の少なくとも3つによって特徴付けられる。1実施形態において、腫瘍性障害または癌は、上の特色の少なくとも4つによって特徴付けられる。1実施形態において、腫瘍性障害または癌は、上の特色の少なくとも5つによって特徴付けられる。1実施形態において、腫瘍性障害または癌は、上の特色の6つすべてによって特徴付けられる。

40

【0093】

したがっていくつかの実施形態において、本発明の化合物は、アポトーシスの能力を回復することまたはアポトーシスを誘導することによって機能する。他の実施形態において、本発明の化合物は、血管形成を減少、低下または阻害することによって機能する。なお

50

他の実施形態においては、本発明の化合物は、細胞外マトリックスを回復させるかまたは再度確立させることにより機能する。他の実施形態において、本発明の化合物は、細胞周期制御を回復することによって機能する。なお他の実施形態において、本発明の化合物は、解糖からミトコンドリア酸化的リン酸化へ代謝管理を逆にシフトすることによって機能する。さらなる実施形態においては、本発明の化合物は、免疫監視を回復させること、または癌細胞を異物として認識する体の能力を回復させることにより機能する。

【0094】

いずれかの特定の理論によって拘束されることを望むものではないが、通例、一体となって癌を発症する協調された段階的に起こるイベントがあると考えられる。すなわち、いくつかの実施形態において、癌は、1 遺伝子-1 タンパク質-根本因果関係のみに依存しているわけではない。いくつかの実施形態においては、癌は、変化した組織状態（例えば、エネルギー論、転移の可能性を可能にする細胞外マトリックスの完全性の不全、免疫監視の欠如、および／または変化した血管形成の状態）である腫瘍になる、組織の変化および変更を現す生理学的疾患状態である。

【0095】

原発性癌細胞（すなわち、悪性形質転換の部位付近から得た細胞）は、十分に確立された技法、特に組織学的検査によって、非癌性細胞からただちに区別することができる。癌細胞の定義は、本明細書で使用する場合、原発性癌細胞だけではなく、癌幹細胞、ならびに癌前駆細胞または癌祖先細胞（cancer cell ancestor）に由来するいずれの細胞も含む。これは転移癌細胞、ならびに癌細胞に由来するインビトロ培養物および株化細胞を含む。固形腫瘍として正常に現れる癌細胞の種類に言及するとき、「臨床的検出可能な」腫瘍は、腫瘍塊に基づいて；例えばCATスキャン、MR画像、X線、超音波もしくは触診、などの手順によって検出可能であるおよび／または患者から入手可能な試料中の1つ以上の癌特異的抗原の発現のために検出可能である腫瘍である。

【0096】

「肉腫」という用語は概して、胚性結合組織のような物質から成り、概して線維物質または均質物質に埋込まれた密に充填された細胞から構成される腫瘍を指す。本発明の環境影響因子によって処置できる肉腫の例は、限定されるわけではないが、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アバネシー（Abmet hy's）肉腫、脂肪肉腫、リポ肉腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色肉腫、絨毛癌腫、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質性肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞の免疫芽細胞肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽細胞肉腫、イエセン肉腫、カポジ肉腫、クップファー細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉肉腫、傍骨性肉腫、細網肉腫、ラウス肉腫、漿液嚢胞性肉腫、滑膜肉腫、および毛細管拡張性（telangiectaltic）肉腫を含む。

【0097】

「黒色腫」という用語は、皮膚および他の器官のメラニン細胞系から生じる腫瘍を意味すると解釈される。本発明の環境影響因子によって処置できる黒色腫は、限定されるわけではないが、例えば末端黒子型黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、ハーディングーパッサー黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、結節性黒色腫、爪下黒色腫、および表在拡大型黒色腫を含む。

【0098】

「癌腫」という用語は、周囲組織に浸潤して転移を生じる傾向がある上皮細胞から成る、悪性新生物を指す。「癌腫」という用語は、周囲組織に浸潤して転移を生じる傾向がある上皮細胞から成る、悪性新生物を指す。本発明の環境影響因子によって処置できる癌腫は、限定されるわけではないが、例えば腺房癌腫、腺房細胞癌腫、腺嚢癌腫、腺様嚢胞癌腫、腺腫性癌腫、副腎皮質の癌腫、肺泡癌腫、肺泡細胞癌腫、基底細胞（basal cell）癌腫、基底細胞（basocellulare）癌腫、類基底細胞癌腫、基底有棘細胞癌腫、気管支肺泡上皮癌腫、細気管支癌腫、気管支原性癌腫、大脳様（cereb

riform) 癌腫、胆管細胞癌腫、絨毛癌腫、コロイド癌腫、面皰癌腫、子宮体癌腫、篩状癌腫、鑑状癌腫、皮膚癌腫、円柱癌腫、円柱細胞癌腫、腺管癌腫、硬癌腫、胎児性癌腫、脳様癌腫、類表皮(epiermoid)癌腫、腺様上皮癌腫、外向発育癌腫、潰瘍癌腫、線維(fibrosus)癌腫、膠様(gelatiniform)癌腫、膠様(gelatinous)癌腫、巨細胞(giant cell)癌腫、巨細胞(gigantocellulare)癌腫、腺癌腫、顆粒膜細胞癌腫、毛母癌腫、血性(hematoid)癌腫、肝細胞癌腫、ヒュルトレ細胞癌腫、ヒアリン癌腫、明細胞腺(hypermephr oid)癌腫、小児胎児性癌腫、上皮内癌腫、表皮内癌腫、上皮内癌腫、Krompecher癌腫、クルチツキー細胞癌腫、大細胞癌腫、レンズ状(lenticular)癌腫、レンズ状(lenticulare)癌腫、脂肪性癌腫、リンパ上皮癌腫 10
、髄様癌腫(carcinoma medullare)、髄様癌腫(medullary carcinoma)、黒色癌腫、軟癌腫(carcinoma molle)、粘液性癌腫、粘液分泌癌腫(carcinoma muciparum)、粘液細胞癌腫、粘液性類表皮癌、粘膜癌腫(carcinoma mucosum)、粘膜癌腫(mucous carcinoma)、粘液腫癌腫(carcinoma myxomatodes)、上咽頭癌、燕麦細胞、骨化性癌腫、類骨癌腫、乳頭状癌腫、門脈周囲癌腫、前浸潤癌腫、有棘細胞癌腫、粥状癌腫(pultaceous carcinoma)、腎細胞癌腫、予備細胞癌腫、肉腫様癌腫、シュナイダー癌腫、硬性癌腫、陰囊癌腫、印環細胞癌腫、単純癌腫、小細胞癌腫、ソラノイド(solano id)癌腫、回転楕円面細胞癌腫、紡錘体細胞癌腫、海綿様癌腫、扁平上皮癌腫、扁平上皮細胞癌腫、ストリング癌腫(string carcinoma)、血管拡張性癌腫、毛細管拡張症様癌腫、移行細胞癌腫、結節状癌腫(carcinoma tuberosum)、結節状癌腫(tuberous carcinoma)、いぼ状癌腫、および絨毛癌腫を含む。

【0099】

一般に環境影響因子は、いずれの新生物も予防的にまたは治療的に処置するために使用され得る。1実施形態において、本発明の環境影響因子は、固形腫瘍を処置するために使用される。本発明の各種の実施形態において、環境影響因子(例えばCoQ10)は、各種の種類の皮膚癌(例えば扁平上皮細胞癌腫または基底細胞癌腫)、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、または骨癌の処置に使用される。1実施形態において、環境影響因子、例えばCoQ10は、限定されるわけではないが、扁平上皮細胞癌腫(SCCIS 30
(上皮内)およびさらに侵襲性扁平上皮細胞癌腫を含む)、基底細胞癌腫(表在癌腫、結節性癌腫および浸潤性基底細胞癌腫を含む)、黒色腫、および光線性角化症を含む、皮膚腫瘍性障害の処置に使用される。しかし、環境影響因子を使用する処置は、上述の種類の癌に限定されない。環境影響因子を用いた処置に適する癌の例は、限定されるわけではないが、脳腫瘍、頭部頸部癌、前立腺癌、乳癌、精巣癌、膵臓癌、肝臓癌、結腸癌、膀胱癌、腎臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、中皮腫、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、肉腫、骨癌、胃癌および髄芽細胞腫を含む。

【0100】

本発明の環境影響因子によって処置することができる追加の癌は、例えばホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、 40
原発性血小板増加症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺腫瘍、原発性脳腫瘍、胃癌、結腸癌、悪性膵島細胞腺腫、悪性カルチノイド、膀胱癌、前癌皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質癌、および前立腺癌を含む。1実施形態において、環境影響因子、例えばCoQ10によって処置することができる腫瘍性障害または癌は、黒色腫ではない。

【0101】

癌細胞の定義は、本明細書中で使用される場合は、嫌氣的解糖(例えば、解糖、それに続くサイトゾル中での乳酸発酵)、好氣的解糖(例えば、解糖、それに続くミトコンドリア中でのピルビン酸の酸化)、または嫌氣的解糖と好氣的解糖の組み合わせによりエネルギー 50

ギーを産生する癌細胞を含むように意図される。1実施形態において、癌細胞は、主に嫌氣的解糖によってエネルギーを産生する（細胞のエネルギーの例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上が嫌氣的解糖によって産生される）。1実施形態において、癌細胞は、主に好氣的解糖によってエネルギーを産生する（細胞のエネルギーの例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上が嫌氣的解糖によって産生される）。癌細胞の定義は、本明細書で使用する場合、嫌氣的解糖によってエネルギーを産生する細胞および好氣的解糖によってエネルギーを産生する細胞を備える癌細胞集団または癌細胞の混合物を含むことも意図される。1実施形態において、癌細胞集団は、嫌氣的解糖によってエネルギーを産生する細胞を主に備える（集団の細胞の例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上が嫌氣的解糖によってエネルギーを産生する）。1実施形態において、癌細胞集団は、好氣的解糖によってエネルギーを産生する細胞を主に備える（集団の細胞の例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上）。

10

【0102】

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

【0103】

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

20

【0104】

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

【0105】

本発明はまた、ヒトにおいて侵襲性腫瘍性障害を診断するための方法を提供する。この方法には、侵襲性が低いもしくは非侵襲性の腫瘍性障害のために使用または選択される投薬レジメンよりも少ない選択された用量で、ヒトに対して環境影響因子を投与することが含まれ、それにより、侵襲性腫瘍性障害が診断される。関連する態様において、本発明は、ヒトにおいて非侵襲性腫瘍性障害を診断するための方法を提供する。この方法には、侵襲性腫瘍性障害のために使用または選択される投薬レジメンよりも多い選択された用量で、ヒトに対して環境影響因子を投与することが含まれ、それにより非侵襲性腫瘍性障害が診断される。

30

【0106】

本明細書で使用する場合、「侵襲性腫瘍性障害」という用語は、急成長腫瘍を包含する腫瘍性障害を指す。侵襲性腫瘍性障害は通例、治療処置に応答しない、または不十分にしか応答しない。侵襲性腫瘍性障害の例は、限定されるわけではないが、膵臓癌腫、肝細胞癌腫、ユーイング肉腫、転移性乳癌、転移性黒色腫、脳腫瘍（星状細胞腫、神経膠芽腫）、神経内分泌癌、結腸癌、肺癌、骨肉腫、アンドロゲン非依存性前立腺癌、卵巣癌および非ホジキンリンパ腫を含む。

40

【0107】

本明細書で使用する場合、「非侵襲性腫瘍性障害」という用語は、低成長腫瘍を包含する腫瘍性障害を指す。非侵襲性腫瘍性障害は通例、治療処置に有利にまたは中程度に応答する。非侵襲性腫瘍性障害の例は、限定されるわけではないが、非転移性乳癌、アンドロゲン依存性前立腺癌、小細胞肺癌および急性リンパ球性白血病を含む。1実施形態において、非侵襲性腫瘍性障害は、侵襲性腫瘍性障害でないいずれの腫瘍性障害も含む。

【0108】

50

I. 環境影響因子

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

【0109】

1. 多次元細胞内分子 (MIM)

「多次元細胞内分子 (MIM)」という用語は、体によって自然に産生されるおよび／またはヒトの少なくとも1つの細胞中に存在する内因性分子の単離されたものまたは合成産生されたものである。MIMは、以下の機能の1つ以上、2つ以上、3つ以上、またはすべてによって特徴付けられる。MIMは細胞に進入することが可能であり、細胞への進入は、分子の生物活性部分が完全に細胞に進入する限り、細胞への完全または部分進入を含む。MIMは、細胞内でシグナル伝達および／または遺伝子発現機構を誘導することが可能である。MIMは、治療薬および担体の両方、例えば薬物送達効果を有するという点で多次元である。MIMはまた、疾患状態において1つの方法で作用し、正常な状態においては異なる方法で作用するという点で多次元である。例えばC o Q-10の場合、V E G Fの存在下での黒色腫細胞へのC o Q-10の投与は、B c 12レベルの低下をもたらす。次に黒色腫細胞の発癌能の低下をもたらす。対照的に、正常な線維芽細胞において、C o Q-10およびV E F Gの同時投与は、B c 12のレベルに対する効果は有さない。好ましくはMIMは、疾患状態の細胞において選択的に作用し、正常な状態の (マッチング) 細胞において実質的に効果を有さない。好ましくはMIMは、疾患状態の細胞を、表現型、代謝状態、遺伝子型、mRNA／タンパク質発現レベルなどで正常な状態の (マッチング細胞) に選択的に近づける。

【0110】

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

【0111】

MIMは、脂質ベース分子または非脂質ベース分子であることができる。MIMの例は、限定されるわけではないが、C o Q 10、アセチルC o - A、パルミチルC o - A、L-カルニチン、例えばチロシン、フェニルアラニン、およびシステインなどのアミノ酸を含む。1実施形態において、MIMは小型分子である。本発明の1実施形態において、MIMはC o Q 10でない。MIMは、本明細書で詳細に記載されたアッセイのいずれかを使用して、当業者によって日常的に同定することができる。

【0112】

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

FAD、ビタミンB2およびADPの一部を備える）およびニコチン酸ジヌクレオチドから選択される。

【0113】

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

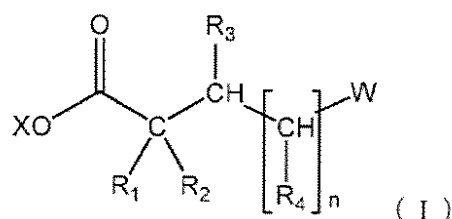
【0114】

いくつかの実施形態において、MIMはグルコース類似体、例えば1個の-OHまたは-CH₂OH置換基が-COOH、-COO⁻または-NH₂置換基によって置換されているグルコース分子である。グルコース類似体の例は、グルコサミン、グルクロン酸、グルクロニドおよびグルクロン酸塩を含む。

【0115】

いくつかの実施形態において、MIMは、式(I)の化合物から選択され：

【化1】



【0116】

式中

nは0または1の整数であり；

R¹、R²、R³およびR⁴は存在するとき、水素およびヒドロキシルからそれぞれ独立して選択される、またはR¹およびR²は、これらが結合されている炭素と共にまとめられてカルボニル(C=O)基を形成し；

Wは-COOHまたは-N(CH₃)₃⁺であり；ならびに

Xは、水素、負の電荷またはNa⁺などのアルカリ金属カチオンである。

【0117】

nが0であるとき、CHR³基がW置換基に結合されていることが理解される。

【0118】

いくつかの実施形態において、Wは-N(CH₃)₃⁺である。いくつかの実施形態において、MIMは、L-カルニチンなどのカルニチンである。

【0119】

いくつかの実施形態において、MIMはジカルボン酸である。いくつかの実施形態において、Wは-COOHである。いくつかの実施形態において、R³は水素である。いくつかの実施形態において、nは0である。いくつかの実施形態において、R¹およびR²はそれぞれ独立して水素である。いくつかの実施形態において、Wは-COOHであり、R³は水素であり、nは0であり、ならびにR¹およびR²はそれぞれ独立して水素である。いくつかの実施形態において、nは1である。いくつかの実施形態において、R¹およびR²は、これらが結合されている炭素と共にまとめられてカルボニル(C=O)基を形成する。いくつかの実施形態において、R⁴は水素である。いくつかの実施形態において、R⁴はヒドロキシルである。いくつかの実施形態において、Wは-COOHであり、R³は水素であり、nは1であり、ならびにR¹およびR²は、これらが結合されている炭素と共にまとめられてカルボニル(C=O)基を形成する。

タンパク質、脂質もしくは代謝産物の変化を誘導する) および／または正常な細胞と比較して罹患細胞の微小環境プロフィールにおける変化を示差的 (例えば優先的) に誘導することが観察される内因性分子は、M I Mとして同定される。

【0125】

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

【0126】

非脂質ベースM I Mを同定する方法は、非脂質ベース内因性分子が細胞に外部から添加される上記の細胞ベース方法を包含する。好ましい実施形態において、非脂質ベース内因性分子は、細胞中の非脂質ベース内因性分子のレベルが上昇するように、細胞に添加される。1実施形態において、非脂質ベース内因性分子のレベルは、未処置対照細胞のレベルと比較して、1. 1倍、1. 2倍、1. 3倍、1. 4倍、1. 5倍、1. 6倍、1. 7倍、1. 8倍、1. 9倍、2. 0倍、3. 0倍、4. 0倍、5. 0倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍またはそれ以上、上昇する。非脂質ベース分子の製剤および細胞への送達は、試験された各分子の特性に依存するが、多くの方法が当分野で公知である。非脂質ベースの分子の製剤および送達の様式の例には、共溶媒による可溶化、担体分子、能動輸送、ポリマー捕捉または吸着、ポリマーグラフト化、リボソーム封入およびターゲット化送達系を用いた製剤を含むがこれに限定されない。非脂質ベースM I Mの細胞への送達は、質量分析法などの当分野で公知の所定の方法による、細胞内容物の抽出およびM I Mの定量によって確認され得る。

【0127】

2. エピメタボリックシフター (エピシフター)

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

【0128】

いくつかの実施形態において、エピシフターは、クレブス回路における1つ以上の反応への触媒作用に直接関与する、またはクレブス回路中間体 (過剰な中間体がクレブス回路

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

【0129】

いくつかの実施形態において、エピシフターはC o Q 1 0の構成単位である。C o Q 1 0の構成単位は、限定されるわけではないが、フェニルアラニン、チロシン、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニル酢酸、3-メトキシ-4-ヒドロキシマンデル酸、バニリン酸、4-ヒドロキシベンゾエート、メバロン酸、ファルネシル、2, 3-ジメトキシ-5-メチルー-p-ベンゾキノン、ならびに対応するその酸またはイオンを含む。いくつかの実施形態において、エピシフターは、フェニルアラニン、チロシン、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニル酢酸および4-ヒドロキシベンゾエートから選択される。

10

【0130】

いくつかの実施形態において、エピシフターはビタミンBファミリーの化合物である。ビタミンBファミリーの化合物は例えば、リボフラビン(ビタミンB 2)、またはその類似体を含む。エピシフターは、本明細書に記載する内因性M I Mなどの、内因性M I Mのいずれにもインビボで代謝され得る、いずれの類似体またはプロドラッグも含む。

20

【0131】

1実施形態において、エピシフターもM I Mである。1実施形態において、エピシフターはC o Q 1 0でない。エピシフターは、本明細書で詳細に記載されたアッセイのいずれかを使用して、当業者によって日常的に同定することができる。

【0132】

(i) エピシフターを同定する方法

エピメタボリックシフター(エピシフター)は、細胞の代謝状態を調節する、例えば健康(または正常な)状態から疾患状態へのおよびまたはその逆の代謝シフトを誘導することが可能である分子であり、これによりヒトにおける細胞、組織、器官系および/または宿主の健康を維持または再建することが可能である。本発明のエピシフターはそれゆえ、罹患状態の診断評価に有用性を有する。本発明のエピシフターは、エピシフターの適用または投与(他の治療分子によるエピシフターの調節)効果が組織微小環境および疾患状態における正常化をもたらす治療用途においてさらなる有用性を有する。

30

【0133】

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

40

【0134】

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

【0135】

エピシフターを同定するために、潜在的エピシフターは次に、細胞の代謝状態をシフト

50

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

10

【0136】

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

20

【0137】

内因性脂質ベース分子のクラスでエピメタボリックシフターを同定するために、示差的な疾患状態、進行、または侵襲性を提示する細胞または組織のパネルについて、脂質プロファイルが確立される。各細胞または組織の脂質プロファイルは、脂質抽出法と、続いて例えば液体クロマトグラフィー連結質量分析法またはガスクロマトグラフィー連結質量分析法を含む、当業者に公知の所定の方法を使用する脂質の同定および定量によって決定される。レベルの変化（大量または微量レベルの上昇または低下）が疾患の状態、進行または侵襲性に相関する脂質は、潜在的エピシフターとして同定される。

30

【0138】

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

40

【0139】

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

【0140】

エピシフターが疾患状態を調節する有用性は、当分野で公知のまたは本明細書で詳細に記載されたいくつかのアッセイを使用して、当業者がさらに評価および確認することがで

50

きる。エピシフターが疾患状態を調節する有用性は、エピシフターの細胞または生物への直接外因性送達によって評価することができる。エピシフターが疾患状態を調節する有用性は代わりに、エピシフター（例えばエピシフターのレベルまたは活性）を直接調節する分子の発生によって評価することができる。エピシフターが疾患状態を調節する有用性はまた、エピシフターと同じ経路に配置された（例えばRNAまたはタンパク質レベルで調節される）遺伝子などの他の分子を調節することによる、エピシフター（例えばエピシフターのレベルまたは活性）を間接的に調節する分子の発生によって評価することができる。

【0141】

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

【0142】

II. MIM／エピシフターを同定するのに有用なアッセイ

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

【0143】

生体エネルギー分子レベルの定量

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

【0144】

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

【0145】

ピルビン酸塩は、細胞代謝経路において重要な中間体である。ピルビン酸塩は、細胞の代謝状態に応じて、糖新生を介して炭水化物に変換され得るか、アセチルCoAを介して

10

20

30

40

50

脂肪酸に変換もしくは代謝され得るか、またはアラニンもしくはエタノールに変換され得る。それゆえピルビン酸塩レベルの検出は、細胞試料の代謝性活性および状態の尺度を提供する。ピルビン酸塩を検出する1つのアッセイは例えば、比色および蛍光定量の両方を使用して、異なる範囲内でのピルビン酸濃度を検出する（EnzyChrom（商標）ピルビン酸アッセイキット（カタログ番号EPYR-100）、BioAssay Systems、Hayward、CA）。

【0146】

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

【0147】

細胞エネルギー特性の測定

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

【0148】

酸化リン酸化およびミトコンドリア機能の測定

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

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

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

【0152】

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

【0153】

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

【0154】

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

【0155】

いくつかの実施形態において、MPTおよびMPTPの形成、中断および／または遂行に対する環境影響因子（例えばMIMまたはエピシフター）の効果の検出および定量が測

10

20

30

40

50

定される。例えばアッセイは、ミトコンドリアおよび他のサイトゾルコンパートメントの内膜内に局在する特殊化染料分子（カルセイン）の使用を通じて検出することができる。別の分子、 CoCl_2 の適用は、サイトゾル中でのカルセイン染料の蛍光をスケルチするよう働く。しかし、 CoCl_2 はミトコンドリアの内部にはアクセスすることができず、したがって、MPTが起これ、 CoCl_2 がMPTによりミトコンドリアの内部にアクセスできるようにならない限りは、ミトコンドリア内のカルセインの蛍光は抑え込まれないミトコンドリア特異的蛍光シグナルの消失は、MPTの発生を通知する。フローサイトメトリーが使用されて、細胞および細胞小器官の蛍光を評価することができる（Mit o Probe（商標）遷移孔アッセイキット、M o l e c u l a r P r o b e s、E u g e n e、O R）。追加のアッセイは、実験結果を評価するために蛍光顕微鏡を利用する（I m a g e - i T（商標）L I V Eミトコンドリア遷移孔アッセイキット、M o l e c u l a r P r o b e s、E u g e n e、O R）。 10

【0156】

細胞増殖および炎症の測定

本発明のいくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばMIMまたはエピシフター）は、細胞増殖および／または炎症に関連する分子の産生または活性に対するその影響によって同定および評価され得る。これらの分子は、限定されるわけではないが、サイトカイン、成長因子、ホルモン、細胞外マトリックスの構成要素、ケモカイン、神経ペプチド、神経伝達物質、ニューロトロフィンおよび細胞シグナル伝達に關与する他の分子、ならびにシグナル伝達に關与する細胞内分子などの細胞内分子を含む。 20

【0157】

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

【0158】

本発明のいくつかの実施形態において、環境影響因子（例えばMIMまたはエピシフター）は、VEGFの産生に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。例えば低酸素条件またはアシドーシスを模倣する条件で維持された細胞は、VEGF産生の向上を呈するであろう。培地中に分泌されたVEGFは、ELISAまたは、利用可能な抗VEGF抗体（R&D Systems, Minneapolis, MN）を使用する他の抗体ベースアッセイを使用してアッセイすることができる。本発明のいくつかの実施形態において、エピシフターは、細胞のVEGFへの応答性に対するその効果に基づいておよび／またはVEGF受容体の発現もしくは活性に対するその効果に基づいて同定および／または特徴付けされ得る。 30

【0159】

腫瘍壊死因子（TNF）は、健常免疫系機能ならびに自己免疫疾患の両方に関わり、炎症および免疫系活性化の主要なメディエータである。本発明のいくつかの実施形態において、エピシフターは、TNFの産生または活性に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。例えば培養細胞により産生され、培地中に分泌されたTNFは、ELISAおよび当分野で公知の他の抗体ベースアッセイを介して定量することができる。さらに、いくつかの実施形態において、環境影響因子は、TNFの受容体（ヒトTNF RI Duo set, R&D Systems, Minneapolis, MN）の発現に対するその効果によって同定および特徴付けされ得る。 40

【0160】

細胞外マトリックス（ECM）の構成要素は、細胞および組織の構造ならびにシグナル伝達プロセスの両方において役割を果たす。例えば潜在型形質転換成長因子ベータ結合タンパク質は、ECM内に形質転換成長因子ベータ（TGFβ）のリザーバを生成するECM構成要素である。マトリックス結合TGFβは、マトリックス再構築のプロセスの間に放出され、付近の細胞に成長因子効果を及ぼすことができる（Dallas, S. Met 50

hods in Mol. Biol. 139:231-243 (2000))。

【0161】

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

10

【0162】

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

20

【0163】

原形質膜完全性および細胞死の測定

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

【0164】

乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）のアッセイは、細胞ステータスおよび損傷のレベルの測定を提供することができる。LDHは、安定で比較的豊富な細胞質酵素である。原形質膜が物理的完全性を失うとき、LDHは細胞外コンパートメントへ逃れる。LDHのより高い濃度は、原形質膜損傷および細胞死のより高いレベルと相関する。LDHアッセイの例は、試料中のLDHのレベルを検出および定量する比色系を使用し、テトラゾリウム塩の還元型がLDH酵素の活性を介して産生されるアッセイを含む（Quantichrom（商標）乳酸デヒドロゲナーゼキット（DLDH-100）、BioAssay Systems、Hayward, CA；LDH細胞傷害性検出キット、Clontech、Mountain View, CA）。

30

【0165】

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

40

50

(Promega Corp.、Madison、WI)を含む。

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

III. 本発明の使用

本発明は腫瘍性障害を診断するための方法を提供する。本発明の方法は、腫瘍性障害の再発および／または腫瘍性障害について処置されている被験体の生存を予後診断するために、訓練を積んだ実施者に使用される任意の他の方法と組み合わせて実施され得る。例えば、本発明の方法は、被験体から得られた試料の形態学的または細胞学的分析と併せて実施されてもよい。細胞学的方法には、任意の他の分子マーカーの、それ自体の、他のマーカーと併せての、および／またはShcマーカーと組み合わせての免疫組織学的または免疫蛍光検出(および適切な場合、定量)が含まれる。他の方法には、インサイチュPCRによる、または組織を抽出することおよびリアルタイムPCRによって他のマーカーを定量することによる、他のマーカーの検出が含まれる。PCRはポリメラーゼ連鎖反応として定義される。

【0169】

処置レジメン(例えば、化学療法、放射線治療、外科手術、ホルモン療法、または被験体の腫瘍性障害を処置するために有用な任意の他の治療的アプローチ)の有効性を評価するための方法もまた提供される。これらの方法において、試料対(第1の試料は処置レジメンに供されておらず、第2の試料は処置レジメンの少なくとも一部に供されている)におけるマーカーの量が評価される。

【0170】

本発明はまた、腫瘍性障害が侵襲性であるかどうかを決定するための方法を提供する。上記方法には、細胞中に存在するマーカーの量を決定すること、およびこの量を、定義の中で定義した対照試料中に存在するマーカーの対照量に対して比較することが含まれ、それにより腫瘍性障害が侵襲性であるかどうか決定される。

【0171】

本発明の方法はまた、腫瘍性障害の侵襲性を調節する、すなわち、低下させることができる化合物を選択するために使用され得る。この方法では、癌細胞が試験化合物と接触せられ、癌細胞中の本発明のマーカーの発現および／または活性を調節する上記試験化合物の能力が決定され、それにより、腫瘍性障害の侵襲性を調節することができる化合物が選択される。

【0172】

本明細書に記載される方法を使用して、特に、細胞膜を横切ることが可能であるように十分に小さい分子を含む種々の分子が、本発明のマーカーの発現および／または活性を調節、例えば、増加する分子を同定するためにスクリーニングされてもよい。そのように同定された化合物は、被験体の腫瘍性障害の侵襲性を阻害するために、被験体の腫瘍性障害の再発を予防するために、または被験体の腫瘍性障害を処置するために被験体に提供され得る。

【0173】

I V. 本発明のマーカー

本発明は、表2～4および6～29に列挙されるマーカー（本明細書中以後、「バイオマーカー」、「マーカー」、または「本発明のマーカー」）に関する。本発明は、マーカーによってコードされるか、またはマーカーに対応する核酸およびタンパク質（本明細書中以後、それぞれ、「マーカー核酸」および「マーカータンパク質」）を提供する。これらのマーカーは、腫瘍性障害の存在についてのスクリーニングにおいて、腫瘍性障害の侵襲性および転移の可能性の評価において、被験体が腫瘍性障害に罹患しているかどうかの評価において、腫瘍性障害の処置のための組成物の同定において、腫瘍性障害の処置についての環境影響因子化合物の有効性の評価において、腫瘍性障害の進行の監視において、腫瘍性障害の侵襲性の予後診断において、腫瘍性障害を持つ被験体の生存の予後診断において、腫瘍性障害の再発の予後診断において、ならびに、被験体に腫瘍性障害を発症する素因があるかどうかの予後診断において特に有用である。

10

【0174】

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

20

【0175】

「マーカー」は、正常または健康な組織または細胞中でのその発現レベルからの、1つの組織または細胞中でのその変化した発現レベルが、腫瘍性障害のような疾患状態と関係がある遺伝子である。「マーカー核酸」は、本発明のマーカーによってコードされるか、またはそれに対応する核酸（例えば、mRNA、cDNA）である。このようなマーカー核酸には、任意の配列番号（ヌクレオチド）の全体配列または部分配列またはこのような配列の相補物を含むDNA（例えば、cDNA）が含まれる。マーカー核酸は、任意の配列番号（ヌクレオチド）の全体配列または部分配列またはこのような配列の相補物を含むRNAもまた含み、ここでは、すべてのチミジン残基がウリジン残基に置き換えられている。「マーカータンパク質」は、本発明のマーカーによってコードされるかまたはそれに対応するタンパク質である。マーカータンパク質は、配列番号（アミノ酸）のいずれかの全体配列または部分配列を含む。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、交換可能に使用される。

30

【0176】

「アポトーシスと関連するマーカー」は、アポトーシス経路に関与するマーカーである。例えば、アポトーシスに関与するマーカーには、表6A、6B、7～9、25、および28において列挙されているマーカーが含まれるがこれらに限定されない。具体的には、アポトーシスと関連するマーカーには、Bcl-xl、Bcl-xS、BNIP-2、Bcl-2、Bircl6、Bcl-2-L11（Bim）、XIAP、BRAF、Bax、c-Jun、Bmf、PUMA、およびcMycが含まれる。

40

【0177】

「酸化ストレスと関連するマーカー」は、酸化ストレス経路に関与するマーカーである。例えば、「酸化ストレスと関連するマーカー」には、表10～12に列挙されるマーカーが含まれるがこれらに限定されない。具体的には、酸化ストレスと関連するマーカーには、好中球サイトゾル因子2、1酸化窒素シンターゼ2A、およびスーパーオキシドディスムターゼ2（ミトコンドリア）が含まれる。

【0178】

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

50

これらに限定されない。

【0179】

「血管新生と関連するマーカー」は、血管新生経路に關与するマーカーである。例えば、血管新生と關与するマーカーには、表24および27に列挙されるマーカーが含まれるがこれらに限定されない。

【0180】

「腫瘍性障害と關係がある」体液は、患者の体内にある場合に、腫瘍性細胞と接觸するもしくは腫瘍性細胞を通り抜けるか、またはその中を細胞もしくは腫瘍性細胞から放出されたタンパク質が通り抜けることができる流体である。例示的な腫瘍性障害と關係がある体液としては、血液の液体（例えば、全血、血清、それらから取り出された血小板を含む血液）が挙げられ、これらは以下にさらに詳細に記載される。多くの腫瘍性障害と關係がある体液には、特に、細胞が轉移性である場合には、その中に腫瘍性細胞が含まれ得る。腫瘍性細胞を含む可能性がある、細胞を含有している流体としては、全血、それらから取り出された血小板を含む血液、リンパ液、前立腺液、尿、および精液が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0181】

マーカーの「正常な」発現レベルは、腫瘍性障害に罹患していないヒト被験体または患者の細胞中の上記マーカーの発現レベルである。

【0182】

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

20

【0183】

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

30

【0184】

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

【0185】

「相補的」とは、2つの核酸鎖の領域間、または同じ核酸鎖の2つの領域間での配列相補性の広い概念をいう。第1の核酸領域のアデニン残基は、第1の領域に対して逆平行である第2の核酸領域の残基と、その残基がチミンまたはウラシルである場合に、特定の水素結合（「塩基対形成」）が可能であることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、第1の鎖に対して逆平行である第2の核酸鎖の残基と、その残基がグアニンである場合に、塩基対形成が可能であることが知られている。2つの核酸が逆平行様式で配置され、第1の領域の少なくとも1個のヌクレオチド残基が第2の領域の残基と塩基対形成可能である場合に、核酸の第1の領域は同じかまたは異なる核酸の第2の領域に相補的である。好ましくは、第1の領域は第1の部分を含み、第2の領域は第2の部分を含み、それによって、第1の部分および第2の部分は逆平行様式に配置され、第1の部分の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少な

40

50

くとも約95%のヌクレオチド残基が、第2の部分におけるヌクレオチド残基と塩基対形成が可能である。より好ましくは、第1の部分のすべてのヌクレオチド残基は、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対形成が可能である。

【0186】

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

10

【0187】

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

20

【0188】

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

30

【0189】

いくつかの実施形態においては、生体マーカーは、アポトーシスに関係している（例えば、アポトーシス促進性または抗アポトーシス性）。いくつかの実施形態においては、生体マーカーは、アポトーシス関連遺伝子である。アポトーシス関連遺伝子としては、例えば、表24に列挙する遺伝子が挙げられる。いくつかの実施形態においては、生体マーカーは転写因子である。ある実施形態において、バイオマーカーは酸化ストレスに関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは、カスパーゼ調節因子、例えば、カスパーゼ活性化因子またはカスパーゼインヒビターである。ある実施形態において、バイオマーカーは細胞増殖に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは、細胞周期調節およびDNA合成に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーは、解糖および代謝、例えば、ペントースリン酸経路およびミトコンドリア酸化代謝に関与する。さらなる実施形態において、バイオマーカーは分子輸送に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは細胞シグナル伝達に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーは14-3-3媒介シグナル伝達に関与する。さらなる実施形態において、バイオマーカーは、セラミドシグナル伝達に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーはミトコンドリアタンパク質輸送に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは脂肪細胞分化に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーは脂質およびコレステロール代謝に関与する。さらなる実施形態においては、生体マーカーは血管形成に関与している。ある実施形態において、バイオマーカーは膜流動性に関与する。他の実施形態にお

40

50

いて、バイオマーカーは免疫調節に関与する。なお他の実施形態において、バイオマーカーはゲノム安定性に関与する。さらなる実施形態において、バイオマーカーは細胞外マトリックスタンパク質完全性に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは膜輸送に関与する。他の実施形態において、バイオマーカーは酸化制御に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーはペントースリン酸経路に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーである。ある実施形態において、バイオマーカーはアラキドン酸代謝に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは本明細書中上記に示された経路の2つ以上に関与する。ある実施形態において、バイオマーカーは本明細書中上記に示された経路の3つ以上、4つ以上、5つ以上などに関与するある実施形態において、1つより多くのバイオマーカーが、本発明に

10

【0190】

ある実施形態において、特定の挙げられた遺伝子が、処置後の異なる期間または各種の濃度の潜在的な環境影響因子（例えばC o Q 1 0）による処置などの、1を超える処置条件に関連している場合、その特定の遺伝子の倍率変化は最長記録処置時間を指す。他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、最短記録処置時間を指す。他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、e n v 影響因子（例えばC o Q 1 0）の最高濃度による処置を指す。他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、e n v 影響因子（例えばC o Q 1 0）の最低濃度による処置を指す。また他の実施形態において、その特定の遺伝子の倍率変化は、e n v 影響因子の治療効果と一致する方式における調節（例えば上方または下方調節）を指す。

20

【0191】

特定の実施形態においては、正または負の倍率変化は、表2～4および6～29のいずれかに列挙する任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態においては、正または負の倍率変化は、1つの表を除く（例えば、表1を除く、表5を除くなど）、表2～4および6～29のいずれかに列挙する任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態においては、正または負の倍率変化は、いずれか2つの表を除く（例えば、表1と5を除く、表2と16を除くなど）、表2～4および6～29のいずれかに列挙する任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態においては、正または負の倍率変化は、いずれか3つの表を除く；またはいずれか4つの表を除く；またはいずれか5個、6個、7個、8個、9個、10個、もしくはそれ以上の表を除く、表2～4および6～29のいずれかに列挙する任意の遺伝子の変化をいう。特定の実施形態においては、正または負の倍率変化は、表1、5、9、12を除く、表2～4および6～29のいずれかに列挙する任意の遺伝子の変化をいう。

30

【0192】

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

【0193】

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

40

【0194】

本発明の種々の態様は以下のサブセクションにおいてさらに詳細に説明される。

【0195】

1. 単離された核酸分子

本発明の1つの態様は、マーカータンパク質またはその一部をコードする核酸を含む単離された核酸分子に関する。本発明の単離された核酸には、マーカー核酸分子を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用のために十分な核酸分子、およびマーカー核酸分子のフラグメント、例えば、マーカー核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマーとしての使用のために適切なものもまた含まれる。本明細書で使用する

50

場合、「核酸分子」という用語は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）およびヌクレオチドアナログを使用して生成されたDNAまたはRNAのアナログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0196】

「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されているものである。1つの実施形態において、「単離された」核酸分子は、その核酸が由来する生物のゲノムDNA中の核酸（すわわち、核酸の5'および3'末端に位置する配列）に天然に隣接する配列（好ましくは、タンパク質コード配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離された核酸分子は、その核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸分子に天然に隣接するヌクレオチド配列の約5kB、4kB、3kB、2kB、1kB、0.5kB or 0.1kB未満を含むことができる。別の実施形態において、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術によって産生されたときには他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まず、または化学合成された場合には、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことがあり得る。細胞物質を実質的に含まない核酸分子には、約30%、20%、10%、または5%未満の異種核酸（本明細書では「夾雑核酸」とも呼ばれる）を有する調製物が含まれる。

10

【0197】

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

20

【0198】

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

30

【0199】

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

【0200】

さらに、本発明の核酸分子は、核酸配列の一部のみを含むことができ、ここで、全長核酸配列はマーカー核酸を含み、またはこれはマーカータンパク質をコードする。このような核酸は、例えば、プローブまたはプライマーとして使用できる。プローブ／プライマーは、典型的には、1つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして使用される。このオリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、本発明の核酸の少なくとも約7、好ましくは約15、より好ましくは約25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、または400以上の連続するヌクレオチドにハイブリダイズする核酸配列の領域を含む。

40

【0201】

本発明の核酸分子の配列に基づくプローブは、本発明の1つ以上のマーカーに対応する

50

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

【0202】

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

10

【0203】

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

【0204】

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

20

【0205】

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

30

【0206】

別の実施形態において、単離された核酸分子は、少なくとも7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500、またはそれ以上のヌクレオチド長であり、ストリンジェントな条件下で、マーカー核酸またはマーカータンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、少なくとも60%（65%、70%、好ましくは75%）互いに同一であるヌクレオチド配列が通常互いにハイブリダイズしたままであるハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を説明することが意図される。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989). のセクション6. 3. 1-6. 3. 6において見い出すことができる。好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、約45℃の6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、続いて50-65℃での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄である。

40

50

【0207】

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

10

【0208】

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

20

【0209】

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

30

40

【0210】

本発明は、アンチセンス核酸分子、すなわち、本発明のセンス核酸に相補的である分子を包含し、これは例えば、二本鎖マーカーcDNA分子のコード鎖に相補的であり、またはマーカーmRNA配列に相補的である。したがって、本発明のアンチセンス核酸は、本発明のセンス核酸に水素結合（すなわち、アニーリング）できる。アンチセンス核酸は、全体のコード鎖またはその一部にのみ、例えば、タンパク質のコード領域（またはオープンリーディングフレーム）のすべてまたは一部に相補的であり得る。アンチセンス核酸分子はまた、マーカータンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域のすべてまたは一部に対してアンチセンスでもあり得る。非コード領域（「5'および3'非翻訳領域」）は、コード領域に隣接し、アミノ酸に翻訳されない5'および3'配列

50

である。

【0211】

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

【0212】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果、これらがマーカータンパク質をコードする細胞mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイズし、またはそれらと結合し、それによって、例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって、マーカーの発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するために従来のヌクレオチド相補性によってであり得、または、例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重ヘリックスの大きな溝における特異的相互作用を通してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位への直接の注射または腫瘍性障害と関係がある体液へのアンチセンス核酸の注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的とするために修飾でき、次いで、全身投与できる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、これらが、例えば、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体にアンチセンス核酸分子を連結することによって、選択された細胞表面上で発現される受容体または抗原に特異的に結合するように修飾できる。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載されるベクターを使用しても細胞に送達できる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なpol I Iまたはpol I I Iプロモーターの制御下に配置されているベクター構築物が好ましい。

【0213】

本発明のアンチセンス核酸分子は、 α アノマー型核酸分子であり得る。 α アノマー型核酸分子は、相補RNAとともに特定の二本鎖ハイブリッドを形成し、そこでは、通常の α

単位とは反対に、これらの鎖は互いに平行に走る (Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res 15: 6625~6641 に記載されている方法を使用して製造できる。アンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド (Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131~6148) またはキメラRNA-DNAアナログを含むことができる (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327~330 に記載されている方法を使用して製造できる。

【0214】

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

【0215】

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

【0216】

種々の実施形態において、本発明の核酸分子は、塩基部分、糖部分、またはリン酸バックボーンにおいて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善するために修飾できる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸バックボーンは、ペプチド核酸を生成するために修飾できる (Hyrup et al., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4 (1): 5-23に概説されている)。を参照のこと)。本明細書で使用される場合、「ペプチド核酸」または「PNA」という用語は、核酸模倣物、例えば、DNA模倣物であり、ここでは、デオキシリボースリン酸バックボーンが擬ペプチドバックボーンによって置き換えられており、4種の天然の核酸塩基のみが保持されている。PNAの天然バックボーンは、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを許容することが示されてきた。PNAの合成は、Hyrup et al. (1996), supra; Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670~675に記載されるように、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施できる。

【0217】

PNAは、治療的および診断的適用において使用できる。例えば、PNAは、例えば、転写もしくは翻訳の停止または複製の阻害を誘導することによって、遺伝子発現の配列特

異的調節のためのアンチセンスまたはアンチ遺伝子剤として使用できる。PNAはまた、例えば、遺伝子中の単一の塩基対変異の分析において、例えば、PNA指向性PCRクランプングによって、他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼと組み合わせて使用されるときの人工制限酵素として（Hyrup（1996）、前出）；またはDNA配列決定およびハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして（Hyrup, 1996、前出；Perry-O'Keefe et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670~675）使用できる。

【0218】

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

【0219】

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

【0220】

本発明は、分子ビーコンが試料中の本発明の核酸の存在を定量するために有用であるような、本発明の核酸に相補的である少なくとも1つの領域を有する分子ビーコン核酸もまた含む。「分子ビーコン」核酸は、1対の相補的領域、ならびに蛍光団およびそれに付随

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

【0221】

2. 単離されたタンパク質および抗体

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

【0222】

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

【0223】

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

【0224】

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

【0225】

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

【0226】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成できる。2つの配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264~2268のアルゴリズムであって、これはKarlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873~5877によって改変されている。このようなアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403~410のBLASTNおよびBLASTXプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、BLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施できる。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTPプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施できる。比較目的のためのギャップ付きアラインメントを得るために、ギャップ付きBLASTと呼ばれるBLASTアルゴリズムのより新しいバージョンが、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402に記載されるように利用でき、これは、プログラムBLASTN、BLASTP、およびBLASTXのためのギャップ付き局所的アラインメントを実施することが可能である。あるいは、PSI-Blastが、分子間の距離の関係性を検出する繰り返し検索を実施するために使用できる。BLAST、ギャップ付きBLAST、およびPSI-Blastプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、BLASTXおよびBLASTN）のデフォルトパラメーターが使用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照のこと。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, (1988) CABIOS 4: 11~17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用するとき、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4が使用できる。局所的配列類似性およびアラインメントの領域を同定するためのなお別の有用なアルゴリズムは、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444~2448に記載されるようなFASTAアルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するためのFASTAアルゴリズムを使用するとき、PAM120重み残基表は、例えば、k組値2を用いて使用できる。

【0227】

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

【0228】

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

【0229】

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

【0230】

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

【0231】

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

【0232】

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

【0233】

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

10

【0234】

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

20

【0235】

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

30

40

【0236】

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

50

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

【0237】

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

【0238】

本発明の別の態様は、本発明のタンパク質に対して指向される抗体に関する。好ましい実施形態において、抗体は、マーカータンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する。本発明で交換可能に使用される「抗体」および「抗体群」という用語は、免疫グロブリン分子ならびに免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を含むそのフラグメントおよび誘導体をいう（すなわち、このような部分は、マーカータンパク質、例えば、マーカータンパク質のエピトープなどの抗原を特異的に結合する抗原結合部位を含む）。本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体は、タンパク質を結合するが、試料、例えば、天然にタンパク質を含む生物試料中の他の分子は実質的に結合しない抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例には、単鎖抗体（scAb）、F(ab)およびF(ab')₂フラグメントが含まれるがこれらに限定されない。

【0239】

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

【0240】

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

を使用して作製された免疫原組成物などの他のヒトタンパク質を含まないものである。このような様式で、得られる抗体組成物は、本発明のタンパク質以外のヒトタンパク質の結合が減少しているか、またはその結合がない。

【0241】

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

10

【0242】

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

20

30

【0243】

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

40

50

【0244】

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

【0245】

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

【0246】

より特定には、ヒト化抗体は、例えば、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を

10

20

30

40

50

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

【0247】

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

【0248】

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

【0249】

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

【0250】

本発明のタンパク質に対して指向される抗体は、アフィニティークロマトグラフィーま

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

【0251】

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

【0252】

薬物部分が古典的な化学療法剤に限定されるように構築されているわけではないので、本発明の結合体化抗体は、所定の生物学的応答を修飾するために使用できる。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、リボソーム阻害タンパク質（Better et al., 米国特許第6,146,631号を参照のこと、この開示は、その全体が本明細書に組み込まれる）、アブリン、リシンA、シュートモナスエキソトキシン、またはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、 α インターフェロン、 β インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子などのタンパク質；または、例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-

10

20

30

40

50

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

【0253】

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

【0254】

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

【0255】

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

【0256】

3. 予測医学

本発明は、診断アッセイ、予測アッセイ、薬理ゲノミクス、および臨床的な痕跡を監視することが予後診断 (予測) 目的のために使用され、それによって個体を予防的に治療す

る、予測医学の分野に関する。したがって、本発明の1つの態様は、個体に腫瘍性障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するために、1つまたは複数のマーカータンパク質もしくは核酸の発現レベルを決定するための診断アッセイに関する。このようなアッセイは、予後診断または予測目的のために使用され、それによって、障害の発症の前に個体を予防的に処置できる。

【0257】

本発明のなお別の態様は、臨床試験における本発明のマーカーの発現または活性に対する薬剤（例えば、腫瘍性障害を阻害するため、あるいは任意の他の障害を処置または予防するため（すなわち、そのような処置が有し得る全ての発癌効果を理解するため）のいずれかのために投与される薬物あるいは他の化合物）の影響の監視に関する。これらおよび他の薬剤は、以下のセクションにさらに詳細に記載されている。

【0258】

A. 診断アッセイ

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

【0259】

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

【0260】

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

【0261】

アッセイ成分を固相に固着させるための多くの確立された方法が存在する。これらには、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を通して固定化されているマーカーまたはプローブ分子が含まれるがこれらに限定されない。このようなビオチン化アッセイ成分は、当該分野において公知である技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL）を使用してビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製され、そしてストレプトアビジンコートされた96ウェル

プレート (Pierce Chemical) のウェルに固定化できる。特定の実施形態において、固定化アッセイ成分を有する表面は、前もって調製され、保存できる。

【0262】

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

【0263】

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

【0264】

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

【0265】

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

【0266】

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

【0267】

あるいは、別の実施形態において、類似の診断および予後診断アッセイは、液相中の溶

10

20

30

40

50

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

【0268】

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

【0269】

単離されたmRNAは、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、およびプローブアレイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて使用できる。mRNAレベルの検出のための1つの好ましい診断方法には、検出される遺伝子によってコードされるmRNAにハイブリダイズできる核酸分子（プローブ）と、単離されたmRNAを接触させることを包含する。核酸プローブは、例えば、全長cDNAまたはその一部、例えば、少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり得、本発明のマーカーをコードするmRNAまたはゲノムDNAにストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするために十分であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切

なプローブは本明細書に記載される。mRNAのプローブとのハイブリダイゼーションは、問題のマーカが発現されていることを示す。

【0270】

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

10

【0271】

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

20

【0272】

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

30

【0273】

マーカの絶対的な発現レベルに基づいて決定を行うための代替として、決定は、標準化されたマーカの発現レベルに基づいてもよい。発現レベルは、マーカではない遺伝子、例えば、構成的に発現されるハウスキーピング遺伝子の発現に対してマーカの発現を比較することによって、マーカの絶対的な発現レベルを補正することによって標準化される。標準化のための適切な遺伝子には、アクチン遺伝子または上皮細胞特異的遺伝子などのハウスキーピング遺伝子が挙げられる。この正規化（標準化）により、1つの試料（例えば、患者試料）中の発現レベルの別の試料（例えば、非癌試料）に対する比較、または異なる供給源に由来する試料間での比較が可能となる。

40

【0274】

あるいは、発現レベルは、相対的な発現レベルとして提供できる。マーカの相対的な発現レベルを決定するために、マーカの発現レベルが、癌細胞単離物に対して10またはそれ以上の正常な細胞単離物の試料について、好ましくは、50またはそれ以上の試料について、問題となっている試料について発現レベルを決定する前に決定される。大きな数の試料でアッセイされた遺伝子の各々の平均発現レベルが決定され、これは、マーカについてのベースライン発現レベルとして使用される。次いで、試験試料について決定さ

50

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

【0275】

好ましくは、ベースラインの決定に使用される試料は、非癌細胞由来であろう。細胞供給源の選択は、相対発現レベルの使用に依存する。平均発現スコアとしての、正常組織中で見られる発現の使用は、アッセイされたマーカーが（正常細胞に対して）癌特異的であるかどうかの確認に役立つ。加えて、より多くのデータが蓄積するにつれて、平均発現値が修正でき、蓄積データに基づく改善された相対発現値を提供する。癌細胞からの発現データは、癌の状態の重症度を格付けするための1つの手段を提供する。

【0276】

本発明の別の実施形態において、マーカータンパク質が検出される。本発明のマーカータンパク質を検出するための好ましい因子は、このようなタンパク質またはそのフラグメントに結合可能な抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメントまたは誘導体（例えば、FabまたはF(ab')₂）が使用できる。「標識された」という用語は、プローブまたは抗体に関して、プローブまたは抗体に検出可能な物質をカップリングすること（すなわち、物理的に連結すること）によるプローブまたは抗体の直接的標識、ならびに直接的に標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含することが意図される。間接的標識の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、およびビオチンが蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出できるようなビオチンを用いるDNAプローブの末端標識が含まれる。

【0277】

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

【0278】

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

【0279】

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

【0280】

当業者は、抗体または抗原を結合するための多くの他の適切なキャリアを知っており、本発明に伴う使用のためにこのような支持体を適合できる。例えば、癌細胞から単離されたタンパク質について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上での泳動を行い、ニトロセルロースのような固相支持体上に固定化することができる。次いで、支持体は適切な緩衝液

10

20

30

40

50

で洗浄され、検出可能に標識された抗体を用いる処理を行うことができる。次いで、固相支持体は、緩衝液を用いる2度目の洗浄をされ、未結合の抗体を除去できる。次いで、固体支持体上の結合した標識の量が従来の手段によって検出できる。

【0281】

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

10

【0282】

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

【0283】

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

20

【0284】

B. 薬理ゲノミクス

本発明のマーカールは、薬理ゲノミクスマーカールとしてもまた有用である。本明細書で用いられる場合、「薬理ゲノミクスマーカール」とは、目的の生化学的マーカールであり、その発現レベルは患者の特定の臨床薬物応答または感受性と相関する（例えば、McLeod et al., (1999) Eur. J. Cancer 35 (12): 1650~1652に概説されている）。薬理ゲノミクスマーカール発現の存在または量は、患者の予測される応答に関連し、より特定には、特定の薬物または薬物のクラスを用いる治療に対する患者の代謝性障害に関連する。患者における1つ以上の薬理ゲノミクスマーカールの発現の存在または量を評価することによって、患者にとって最も適切であり、より大きな程度の成功を有すると予測される薬物治療が選択され得る。例えば、患者における特異的な腫瘍マーカールによりコードされるRNAまたはタンパク質の存在あるいは量に基づいて薬物または処置の指針が選択され得、これは、患者に存在するであろう特異的な腫瘍の処置について最適化される。したがって、薬理ゲノミクスのマーカールの使用により、様々な薬物または計画を試すことなく、各癌患者について最も適している処置を選択あるいは設計することが可能となる。

30

40

【0285】

薬理ゲノミクスの別の態様は、身体が薬物に対して作用する方法を変更する遺伝的条件を扱う。これらの薬理ゲノミクス条件は、まれな欠損または多型のいずれかとして起こる可能性がある。例えば、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（G6PD）欠損は一般的な遺伝性酵素病であり、ここでは、主要な臨床的合併症は、酸化性薬物（抗マ

50

ラリア剤、スルホンアミド、鎮痛剤、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0286】

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

【0287】

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

【0288】

C. 臨床試験の監視(モニタリング)

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

【0289】

D. アレイ

本発明は、本発明のマーカを含有するアレイもまた含む。アレイは、アレイ中の1種以上の遺伝子の発現をアッセイするために使用できる。1つの実施形態において、アレイは、アレイ中の遺伝子の組織特異性を確実にするために組織中の遺伝子発現をアッセイするために使用できる。この様式において、約7600個までの遺伝子が発現について同時にアッセイできる。このことは、1つ以上の組織において特異的に発現される一連の遺伝

子を示すプロフィールが開発されることを可能にする。

【0290】

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

10

【0291】

別の実施形態において、アレイは、アレイ中の1種以上の遺伝子の発現の時間経過を監視するために使用できる。これは、本明細書中に開示するように、様々な生物学的状況（例えば、腫瘍性障害の発症、腫瘍性障害の進行、および腫瘍性障害と関係がある細胞形質転換のようなプロセス）において起こり得る。

20

【0292】

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

【0293】

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

30

【0294】

V. 試料を得るための方法

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

【0295】

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

40

【0296】

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

【0297】

1つの実施形態において、新しく得られた生検試料は、例えば、液体窒素またはジフル

50

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

【0298】

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

【0299】

本発明のマーカーを抗体結合に接近可能にするために、試料は修飾される必要がある可能性がある。免疫細胞化学または免疫組織化学の特定の態様において、スライドは、前処理された緩衝液に移され、任意に、抗原接近性を増加するために加熱されてもよい。前処理緩衝液中での試料の加熱は、細胞の脂質二重層を急速に破壊し、抗原（新鮮な試料における場合である可能性はあるが、典型的には、固定された試料で起こることではない）を抗体結合に対してより接近可能にする。「前処理緩衝液」および「調製緩衝液」という用語は、特に、抗体結合のために本発明のマーカーの接近可能性を増加することによって免疫染色のための細胞学的または組織学的試料を調製するために使用される緩衝液をいうために、本明細書では交換可能に使用される。前処理緩衝液は、pH特異的塩溶液、ポリマー、洗剤、または、例えば、エチルオキシレートアニオン性または非イオン性界面活性剤、アルカノエートまたはアルコキシレートもしくはこれらの界面活性剤のブレンドさえ、もしくは胆汁塩の使用さえなどの非イオン性もしくはアニオン性界面活性剤を含んでもよい。前処理緩衝液は、例えば、0.1%~1%のデオキシコール酸、ナトリウム塩、またはラウレスー13-カルボン酸ナトリウム（例えば、Sandopan LS）およびエトキシレートアニオン性錯体であってもよい。ある実施形態において、前処理緩衝液は、スライド保存緩衝液としてもまた使用されてもよい。

【0300】

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

【0301】

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

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

【0302】

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

【0303】

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

【0304】

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

【0305】

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

【0306】

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

【0307】

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

【0308】

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

【0309】

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

【0310】

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

例えば、Ausubel et al., 編, (1987~1999) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New Yorkを参照のこと)。加えて、多数の組織試料が、当業者に周知である技術、例えば、Chomczynskiの1段階RNA単離プロセス(1989, 米国特許第4, 843, 155号)などを使用して容易に処理できる。

【0311】

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

10

【0312】

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

20

【0313】

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

【0314】

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

30

40

【0315】

本発明のマーカーの発現レベルは、メンブレンプロット (ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析において使用されるものなど)。またはマイクロウェル、サンプルチューブ、ゲル、ビーズ、またはファイバー (または結合した核酸を含む任意の固体支持体) を使用して監視されてもよい。米国特許第5, 770, 722号、同第5

50

、874、219号、同第5、744、305号、同第5、677、195号、および同第5、445、934号を参照のこと、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。マーカー発現の検出は、溶液中の核酸プローブを使用することもまた含んでもよい。

【0316】

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

【0317】

リン酸化されたマーカーの量、および／または本発明のマーカーの量の数学的關係は、腫瘍性障害について処置されている被験体における腫瘍性障害の再発のリスク、腫瘍性障害について処置されている被験体の生存、腫瘍性障害が侵襲性であるかどうか、腫瘍性障害の処置についての処置レジメンの有効性などを計算するために、本発明の方法（当業者に公知の回帰分析の方法が含まれ得る）を使用して、使用され得る。例えば、適切な回帰モデルとしては、CART（例えば、Hill, T, and Lewicki, P. (2006) 「STATISTICS Methods and Applications」 StatSoft, Tulsa, OK）、Cox（例えば、www.evidence-based-medicine.co.uk）、指数関数、正規、および対数正規（例えば、www.obgyn.cam.ac.uk/mrg/statsbook/stsurvan.html）、ロジスティック（例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Logistic_regressionまたは<http://faculty.chass.ncsu.edu/garson/PA765/logistic.htm>）、パラメトリック、ノンパラメトリック、セミパラメトリック（例えば、www.socserv.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion）、線形（例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Linear_regressionまたはhttp://www.curvefit.com/linear_regression.htm）、または加法（例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Generalized_additive_modelまたは<http://support.sas.com/rnd/app/da/new/dagam.html>）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0318】

1つの実施形態において、回帰分析にはリン酸化マーカーの量が含まれる。別の実施形態において、回帰分析にはマーカーの数学的関連性が含まれる。なお別の実施形態において、リン酸化マーカーの量および／またはマーカーの数学的関連性の回帰分析には、さらなる臨床的および／または分子の共変量が含まれる。そのような臨床的共変数としては、結節状態（nodal status）、腫瘍の病期、腫瘍の悪性度、腫瘍の大きさ、処置レジメン（例えば、化学療法および／または放射線治療）、臨床的結果（例えば、再発、疾患特異的生存、治療の失敗）、ならびに／あるいは、診断後の時間、治療開始後の時間、および／または処置の完了後の時間の関数としての臨床的結果が挙げられるが、これらに限定されない。

【0319】

別の実施形態においては、リン酸化されたマーカーの量、および／またはマーカーの量

の数学的関係が、腫瘍性障害について処置されている被験体における腫瘍性障害の再発のリスク、腫瘍性障害について処置されている被験体の生存、腫瘍性障害が侵襲性であるかどうか、腫瘍性障害の処置についての処置レジメンの有効性などを計算するために、当業者に公知の回帰分析の方法を含む本発明の方法を使用して、使用され得る。例えば、適切な回帰モデルとしては、CART（例えば、Hill, T, and Lewicki, P. (2006)「STATISTICS Methods and Applications」StatSoft, Tulsa, OK）、Cox（例えば、www.evidence-based-medicine.co.uk）、指数関数、正規、および対数正規（例えば、www.obgyn.cam.ac.uk/mrg/statsbook/stsurvan.html）、ロジスティック（例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Logistic_regressionまたはhttp://faculty.chass.ncsu.edu/garson/PA765/logistic.htm）、パラメトリック、ノンパラメトリック、セミパラメトリック（例えば、www.socserv.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion）、線形（例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Linear_regressionまたはhttp://www.curvefit.com/linear_regression.htm）、または加法（例えば、www.en.wikipedia.org/wiki/Generalized_additive_modelまたはhttp://support.sas.com/rnd/app/da/new/dagam.html）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

【0320】

1つの実施形態において、回帰分析にはリン酸化マーカーの量が含まれる。別の実施形態において、回帰分析にはマーカーの数学的関連性が含まれる。なお別の実施形態において、リン酸化マーカーの量および／またはマーカーの数学的関連性の回帰分析には、さらなる臨床的および／または分子の共変量が含まれる。そのような臨床的共変数としては、結節状態（nodal status）、腫瘍の病期、腫瘍の悪性度、腫瘍の大きさ、処置レジメン（例えば、化学療法および／または放射線治療）、臨床的結果（例えば、再発、疾患特異的生存、治療の失敗）、ならびに／あるいは、診断後の時間、治療開始後の時間、および／または処置の完了後の時間の関数としての臨床的結果が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0321】

VI. キット

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

【0322】

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

40

【0323】

VII. スクリーニングアッセイ

本発明の標的としては、本明細書中の表1～28において以下に列挙する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。出願人によって本明細書に記載された実験の結果に基づいて、Q10によって調節された主要なタンパク質は、転写因子、アポトーシス応答、ペントースリン酸経路、生合成経路、酸化ストレス（酸化促進物質）、膜改変、および酸

50

化的リン酸化代謝を含む異なる経路または分子の群に関連する、または分類することができる。本明細書で提供された結果に基づいて、CoQ10によって調節される主要なタンパク質は下のようにまとめられる。CoQ10によって調節され、転写因子である主要なタンパク質は、HNF4アルファである。CoQ10によって調節され、アポトーシス応答に関連する主要なタンパク質は、Bcl-xl、Bcl-xl、Bcl-xS、BNIP-2、Bcl-2、Birc6、Bcl-2-L11 (Bim)、XIAP、BRAF、Bax、c-Jun、Bmf、PUMA、およびcMycを含む。CoQ10によって調節され、ペントースリン酸経路に関連する主要なタンパク質は、トランスアルドラーゼ1である。CoQ10によって調節され、生合成経路に関連する主要なタンパク質は、COQ1、COQ3、COQ6、プレニルトランスフェラーゼおよび4-ヒドロキシベンゾエートを含む。CoQ10によって調節され、酸化ストレス（酸化促進物質）に関連する主要なタンパク質は、好中球サイトゾル因子2、1酸化窒素シンターゼ2Aおよびスーパーオキシドディスムターゼ2（ミトコンドリア）を含む。CoQ10によって調節され、酸化的リン酸化代謝に関連する主要なタンパク質は、シトクロムc、複合体I、複合体II、複合体IIIおよび複合体IVを含む。CoQ10によって直接または間接的に調節されるさらなる主要なタンパク質は、Foxo3a、DJ-1、IDH-1、Cpt1CおよびカムキナーゼIIを含む。

【0324】

したがって、本発明の1つの実施形態においては、マーカーとして以下を挙げることができる：HNF4-アルファ、Bcl-xl、Bcl-xS、BNIP-2、Bcl-2、Birc6、Bcl-2-L11 (Bim)、XIAP、BRAF、Bax、c-Jun、Bmf、PUMA、cMyc、トランスアルドラーゼ1、COQ1、COQ3、COQ6、プレニルトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシベンゾエート、好中球サイトゾル因子2、1酸化窒素シンターゼ2A、スーパーオキシドディスムターゼ2、VDAC、Baxチャンネル、ANT、シトクロムc、複合体I、複合体II、複合体III、複合体IV、Foxo3a、DJ-1、IDH-1、Cpt1C、およびカムキナーゼII。好ましい実施形態においては、マーカーとして、HNF4A、トランスアルドラーゼ、NM23、およびBScvを挙げることができる。1つの実施形態においては、マーカーはTNF4Aである。1つの実施形態においては、マーカーはトランスアルドラーゼである。1つの実施形態においては、マーカーはNM23である。1つの実施形態においては、マーカーはBScvである。同定されたマーカーの調節因子を同定するために有用なスクリーニングアッセイを以下に記載する。

【0325】

本発明はまた、本発明のマーカーの発現および／または活性を調節することにより癌細胞の侵襲性を調節する調節因子、すなわち、候補もしくは試験化合物または薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド、低分子、もしくは他の薬物）を同定するための方法（本明細書中では、「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる）を提供する。このようなアッセイは、典型的には、本発明のマーカーと1種以上のアッセイ成分の間の反応を含む。他の構成要素は、試験化合物自体、または試験化合物および本発明のマーカーの天然結合パートナーの組み合わせのどちらかであり得る。本明細書中に記載するようなアッセイにより同定した化合物は、例えば、癌細胞の侵襲性を調節する（例えば、阻害する、緩和する、処置する、または予防する）ために有用であり得る。

【0326】

本発明のスクリーニングアッセイで使用される試験化合物は、天然および／または合成化合物の系統的ライブラリーを含む、いずれの利用可能な供給源からも取得され得る。試験化合物はまた：生物ライブラリー；ペプチドライブラリー（ペプチドの官能基を有するが、酵素分解の抵抗性であるが、それにもかかわらず生物活性を保持する新規の非ペプチド主鎖を持つ、分子のライブラリー；例えばZuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 2678~85を参照）；空間的にアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー；逆重畳を必要とする合成ライブラリー法；「

1 ビーズ 1 化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用するライブラリー法を含む、当分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の手法のいずれによっても取得され得る。生物ライブラリーおよびペプチドライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されているが、他の 4 つの手法は化合物のペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリーまたは小型分子ライブラリーに適用できる (Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12:145)。

【0327】

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

【0328】

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

本発明のスクリーニング方法には、癌細胞を試験化合物と接触させること、ならびに細胞中の本発明のマーカの発現および／または活性を調節する試験化合物の能力を決定することが含まれる。本発明のマーカの発現および／または活性は、本明細書に記載されるように決定できる。

【0329】

別の実施形態において、本発明は、本発明のマーカまたはその生物学的に活性な部分の基質である候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。なお別の実施形態において、本発明は、本発明のマーカまたはその生物学的に活性な部分に結合する候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。試験化合物がマーカに直接結合する能力を決定することは、マーカへの化合物の結合が、複合体中の標識されたマーカ化合物を検出することによって決定できるように、例えば、放射性同位元素または酵素標識と化合物を結合させることによって達成できる。例えば化合物 (例えばマーカ基質) に ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H を直接または間接的のどちらかで標識して、放射性同位体を電波放出の直接カウントによってまたはシンチレーションカウントによって検出することができる。あるいは、アッセイ構成要素に例えばホスラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼを酵素標識して、酵素標識を適切な基質の生成物への変換の決定によって検出することができる。

【0330】

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

【0331】

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

【実施例】

【0332】

実施例1：MIMとしてのC o Q 1 0の同定

潜在的なMIMとしてC o Q 1 0を評価するために、酸化型のC o Q 1 0を癌株化細胞および正常な対照株化細胞の両方を含む株化細胞のパネルに外部から添加して、パネルの各株化細胞について細胞微小環境プロフィールに誘導された変化を影響評価した。mRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方を含む、細胞形態／生理機能に対するおよび細胞組成物に対する変化を、正常細胞との比較として罹患細胞について評価および比較した。これらの実験結果は、C o Q 1 0、および特にC o Q 1 0の酸化型をMIMとして同定した。

【0333】

実験の第1セットでは、細胞形態／生理機能に対する変化をC o Q 1 0に対する細胞の感受性およびアポトーシス応答を検査することによって評価した。対照株化細胞（ケラチノサイトおよびメラノサイトの初代培養）および複数の皮膚癌株化細胞（SK-MEL-28、非転移性皮膚黒色腫；SK-MEL-2、転移性皮膚黒色腫；またはSCC、扁平上皮細胞癌腫；PaCa2、膵臓癌株化細胞；またはHEP-G2、肝臓癌株化細胞）を含む皮膚癌株化細胞のパネルを各種のレベルのコエンザイムQ 1 0によって処置した。これらの実験結果は、癌株化細胞が、対照株化細胞と比較して改変された用量依存性応答を癌細胞のみにおけるアポトーシスおよび細胞死の誘導と共に呈することを証明した。例示的な実験を下の実施例3に詳細に記載する。

【0334】

次に、C o Q 1 0による処置後に細胞の組成の変化を影響評価するアッセイを用いた。リアルタイムPCRアレイ法を使用して、mRNAレベルでの遺伝子発現の変化を分析した。例示的な実験を下の実施例6および9～13に詳細に記載する。相補的な実験において、抗体マイクロアレイ法、2次元ゲル電気泳動、それに続く質量分析キャラクタリゼーションを使用するタンパク質同定（identification）を使用することによって、およびウェスタンブロット分析によって、タンパク質レベルでの遺伝子発現の変化を分析した。例示的な実験を下の実施例4、7および8にそれぞれ詳細に記載する。これらのアッセイからの結果は、検査された株化細胞において、遺伝子発現の著しい変化がmRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で、酸化型C o Q 1 0の添加により誘導されることを証明した。C o Q 1 0処置によって調節された遺伝子は、アポトーシス、癌生物学および細胞増殖、解糖および代謝、分子輸送、ならびに細胞シグナル伝達を含む、複数の細胞経路中に密集することが見出された。

【0335】

C o Q 1 0の細胞中への進入を確認し、細胞中に存在するC o Q 1 0のレベルおよび型を決定するために実験を行った。特に、ミトコンドリア中に存在するコエンザイムQ 1 0のレベル、ならびにC o Q 1 0の型（すなわち酸化型または還元型）を、C o Q 1 0で処置した細胞からのミトコンドリア濃縮調製物を分析することによって決定した。ミトコン

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

【0336】

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

【0337】

実施例2：腫瘍性障害の疾患関連プロセスおよびバイオマーカーを同定する方法

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

【0338】

実施例3～8の物質および方法

コエンザイムQ10ストック

500 μ MコエンザイムQ10（細胞増殖培地中5%イソプロパノール）を以下のように調製した。500 μ MコエンザイムQ10ストック10 mLは、毎回更新した。分子量：863.34

$(0.0005 \text{ mol/L}) (0.010 \text{ L}) (863.34 \text{ g/mol}) = 0.004317 \text{ g}$

500 μ Mストック10 mLを作製するために、4.32 mgコエンザイムQ10を15 mLファルコンチューブに秤量して、イソプロパノール500 μ Lを添加した。溶液を完全に溶解するために攪拌しながら、50～60℃の水浴で加温した。本溶液に培地9.5 mL（細胞を培養したのと同じ培地）を添加した。

【0339】

細胞培養

細胞をAmerican Type Culture CollectionまたはGibcoから取得した。細胞を5%ウシ胎仔血清、0.25 μ g/mLアンホテリシン、100 μ g/mLストレプトマイシン、および100 U/mLペニシリンを補足したDMEM/F-12培地で培養した。細胞を37℃の95%空気および5%CO₂の雰囲気中で維持した。

【0340】

コエンザイムQ10処置および全タンパク質単離

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

【0341】

10

株化細胞

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

SK-MEL-28（非転移性皮膚黒色腫）

SK-MEL-2（転移性皮膚黒色腫）

20

HEKa（ケラチノサイト、皮膚対照）

HEMa（メラノサイト、皮膚対照）

nFIB（新生児線維芽細胞）

HEP-G2（肝臓癌）[SBH株化細胞]

SkBr-3（乳癌、Her2過剰発現）

MCF-7（乳癌、p53突然変異）

PC-3（前立腺癌）[SBH株化細胞]

SkBr-3（ヒト乳腺癌）

NCI-ES-0808

SCC（扁平上皮細胞癌腫）

30

PaCa-2

NIH-3T3

細胞培養

細胞をAmerican Type Culture CollectionまたはGibcoから取得した。細胞を5%ウシ胎仔血清、0.25 μ g/mLアンホテリシン、100 μ g/mLストレプトマイシン、および100 U/mLペニシリンを補足したDMEM/F-12培地で培養した。細胞を37°Cの95%空気および5%CO₂の雰囲気中で維持した。

【0342】

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

40

【表 1】

表 1. Q 1 0 に対する感受性について分析された株化細胞

株化細胞	内容	培養条件
P a C a 2	膵臓癌腫	グルタマックス+10%FBS、2.5%ウマ血清、アンホテリシン、ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM/F12
H e p G 2	肝細胞癌腫	10%FBS、アンホテリシン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ビルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を補足した、アール塩を含むMEM
P C 3	前立腺癌	5%FBS、アンホテリシンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを補足した、グルタマックスを含むDMEM/F12
S K B r 3	乳癌	5%FBSおよびアンホテリシン、ペニシリン/ストレプトマイシンを補足した、グルタマックスを含むDMEM/F12
M C F - 7	乳癌	5%FBSおよびアンホテリシン、ペニシリン/ストレプトマイシンを補足した、グルタマックスを含むDMEM/F12

10

【0343】

S K M E L 2 8 細胞の Q 1 0 処置

20

S K - M E L 2 8 細胞を 100 μ M Q 1 0 または対照ビヒクルによって処置した。Q 1 0 の製剤は以下の通りである。15 mL キャップ付きチューブに、Q 1 0 4.32 mg (C y t o t e c h より供給) を移し、次にイソプロパノール 500 μ l の添加により溶解させた。得られた溶液を 65 $^{\circ}$ C の水浴で加温して、高速でボルテックスした。Q 1 0 /イソプロパノール溶液の体積を平衡にした細胞培養培地の添加により、10 mL にした。ストック溶液を次にボルテックスして、Q 1 0 の溶解性を最大にした。ストック溶液を希釈して（培地 8 mL によりストック 2 mL）100 μ M Q 1 0 の最終濃度を取得した。対照ビヒクルでは、培地 9.5 mL をイソプロパノール 500 μ L に添加した。対照ストック（ストック 2 mL）を培地 8 mL でさらに希釈した。細胞を処置開始の 6、16、24、48 または 72 時間後に収集した。

30

【0344】

S C C 細胞の Q 1 0 処置

S C C 細胞を 100 μ M Q 1 0 （上記のように調製）によって 6 時間または 24 時間のどちらかで処置した。対照細胞は未処置細胞であった。処置後、各種の時間にて収集およびペレット化して、ペレットを急速凍結させ、RNA を下記のように X T A L にて単離するまで -80 $^{\circ}$ C にて貯蔵した。

【0345】

RNA 単離

R N e a s y M i n i キット (Q i a g e n, I n c., V a l e n c i a C A) キットをメーカーの説明書に従って使用して、細胞を各種の処置時間に RNA 単離のために溶解させた。RNA を 260 nm における光学密度を測定することによって定量した。

40

【0346】

第 1 鎖合成

第 1 鎖 cDNA を、R T 2 第 1 鎖合成キット (S A B i o s c i e n c e s., F r e d e r i c k M D) をメーカーの推奨に従って使用して、全 RNA 1 μ g から合成した。

【0347】

リアルタイム PCR

第 1 鎖合成からの生成物を水で希釈して、SYBR グリーン・マスター・ミックス (S A B i o s c i e n c e s., F r e d e r i c k M D) と混合し、PCR アレイ上に

50

添加した。リアルタイムPCRをBiorad CFX96でPCRアレイ（アポトーシスアレイ、糖尿病アレイ、酸化ストレスアレイおよび抗酸化防御アレイならびに熱ショックタンパク質アレイ）（SABiosciences, Frederick MD）に対して実行した。

【0348】

アポトーシスのためのネキシンアッセイによる、コエンザイムQ10に対する株化細胞感受性の決定

早期および後期アポトーシスでの細胞のパーセンテージをコエンザイムQ10処置の24時間後に定量した。早期および後期アポトーシスを、コエンザイムQ10に対する各種の癌株化細胞の感受性の相違を理解するためのマーカーとして使用した。試験した各種の株化細胞は、PaCa2、HepG2、PC-3、SKBr3、MCF-7およびSK-MEL28であった。細胞を96ウェルプレート内で一晩接着させた。これらの細胞を対照ビヒクル、50 μ M Q10または100 μ MコエンザイムQ10のいずれかによって処置した。24時間後、アポトーシス細胞の存在がPCA96フローサイトメータ（Guava Technologies, Hayward, CA）で推定された。加えていくつかの細胞を、アポトーシスの正の対照としての4 μ Mスタウロスポリンで2時間処置した。細胞を最初にPBSで洗浄して、Accumax（Innovative Cell

Technologies, San Diego, CA）50 μ Lによって室温にて剥離させた。1%プルロニックF-68（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を含有する培養培地の添加によって、解離を停止させた。ネキシン試薬100 μ L（Guava Technologies, Hayward, CA）を各ウェルに添加した。暗所での20分間のインキュベーションの後、アッセイを低結合プレートにて遂行して、細胞の基質への再結合を最小限に抑えた。ネキシン試薬は2種類の染料を含有している。アネキシン-V-PEは、早期アポトーシス細胞の特徴である、ホスファチジル（phosphatidyl）セリンを細胞の外部にて検出する。第2の染料7-AADは、生（健常）および早期アポトーシス細胞から排除されるが、後期アポトーシス細胞のみに浸透する。4つの細胞集団；生、早期アポトーシス細胞、後期アポトーシスおよび破片のパーセンテージは、Cytosoft 2.5.7ソフトウェア（Guava Technologies, Hayward, CA）を使用して決定した。

【0349】

免疫ブロッティング

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

【0350】

2次元電気泳動

等電点電気泳動（IEF）の前に、試料を40mM Tris、7M尿素、2Mチオ尿素、および1%C7両性イオン洗剤中に溶解させて、トリブチルホスフィンによって還元し、10mMアクリルアミドによって室温にて90分間アルキル化した。試料を10kDaカットオフAmicon Ultraデバイスに通した後、7M尿素、2Mチオ尿素、および2% CHAPSから成る少なくとも3倍量の再懸濁緩衝液によって、試料の伝導率を低下させる。タンパク質100マイクログラムに、11cm pH3~10、pH4~7またはpH6~11の固定化pH勾配ストリップ（GE, Amersham, USA

）にて100,000ボルト時までIEFに供した。IEFの後、固定化pH勾配ストリップを6M尿素、2%SDS、50mM Tris酢酸緩衝液、pH7.0、および0.01%ブロムフェノールブルー中で平衡にして、8~16%Tris-HClプレキャストゲル1mm (Bio-Rad、USA)でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルは2通り実行した。これらにどちらも固定、SYPRO Ruby、80mL/ゲル (Invitrogen、USA)での染色およびFujifilm FLA-5100レーザースキャナーでの撮像、またはPVDF膜上への移動を行った。

【0351】

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

10

【0352】

2次元ゲル画像分析

すべてのゲル画像の分析は、Progenesis Discovery and Pro (Nonlinear Dynamics Inc., Newcastle upon Tyne、UK)を使用して遂行した。スポット検出、マッチング、バックグラウンド除去、正規化、およびフィルタリングの後、SYPRO Rubyゲル画像のデータをエクスポートした。Progenesis Discoveryでスチューデントのt検定を使用して群間の対比較を遂行し、発現が著しく改変されたスポットを同定した ($p > 0.05$)。

20

【0353】

抗体アレイ

抗体マイクロアレイ (Panorama XP725抗体アレイ、Sigma)を利用して700超のタンパク質抗体をスクリーニングし、Q10処置細胞 (SK-MEL-28、SCC)におけるタンパク質濃度レベルの変化を影響評価した。細胞抽出物におけるタンパク質の発現は、スライド上にスポットされた対応する抗体にタンパク質が結合されたときに検出される。結合の前に、タンパク質を蛍光描出および定量的分析に使用される蛍光染料で直接標識する。アレイを異なるCyDye (Cy3またはCy5)によってそれぞれ標識された2つの試料のタンパク質発現プロファイルを比較するために使用して (試験試料対参照試料)、2つの試料を等しいタンパク質濃度でアレイ上に同時に適用する。次に各試料の蛍光シグナル強度を試料の染料標識に対応する波長にて個別に記録して、比較する。

30

【0354】

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

【0355】

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

40

【0356】

50

500 μ M コエンザイム Q10 のストック濃縮物を、イソプロパノール 500 μ l 中に 4.32 mg を溶解することによって調製して、これを培地の添加により 10 ml までさらに希釈した。ボルテックスおよび 65 $^{\circ}$ C までの加熱を交互に行って、コエンザイム Q10 を溶解させた。ストック溶液 2 ml を培地により 10 ml に希釈して、100 μ M Q10 含有培地を得て、これを細胞の処置に使用した。コエンザイム Q10 を添加しないことを除いた類似のプロトコルによって、ビヒクルを並行して調製した。

【0357】

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

【0358】

リアルタイム PCR の前に、全 RNA 0.4~1 μ g をテンプレートとして使用する第 1 鎖 cDNA 合成を、ゲノム DNA 消失ステップを用いる RT2 第 1 鎖合成キット (SABiosciences, Frederick, MD、カタログ番号 C-03) をメーカーの推奨に従って用いて行った。第 1 鎖合成からの生成物を水で希釈して、SYBR グリーン・マスター・ミックス (SABiosciences, Frederick MD、カタログ番号 PA-010-12) と混合し、共通経路内で連結された 84 種類の異なる遺伝子、正規化に使用される 5 種類のハウスキーピング遺伝子、逆転写および PCR 対照を含有する PCR アレイ上に添加した。リアルタイム PCR を Biorad Cfx 96 に対して実行した。酵素を活性化させるホットスタートによって増幅を開始し、それぞれ (95 $^{\circ}$ C-15 秒変性ステップおよび 60 $^{\circ}$ C-1 分アニーリングおよび伸長ステップ) の 40 サイクルが続き、溶融曲線プログラムが続いた。Ct 値 (全ての処置群についての PCR サーマサイクラーによる出力) をエクセルシートにまとめ、<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> で入手できる比較分析ソフトウェアにロードした。

【0359】

ミトコンドリア濃縮試料の精製

実験詳細事項: 100 μ M Q10 によって 24 または 48 時間処置された SKMEL-28 細胞、NCI-E5808 細胞および NIH-3T3 細胞を、 $t=0$ にて収集された細胞と共に、T160 フラスコから洗浄およびこすり落としによって収集した。細胞を遠心分離して、ペレット化し、急速凍結させ、ミトコンドリアが単離されるまで -80 $^{\circ}$ C にて貯蔵した。細胞ペレットを解凍して、再懸濁させ、ダウンスホモジナイザで破碎した。ホモジネートを遠心分離して、培養細胞用ミトコンドリア単離キット (Mitochondria Isolation kit for Cultured cells) (MitoSciences, Eugene OR、カタログ番号 MS852) によって推奨された試薬およびプロトコルを使用してミトコンドリアを単離した。ミトコンドリア画分をアリコートし、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

【0360】

コエンザイム Q10 およびユビキノール-10 の定量方法

コエンザイム Q10 (Q10) および還元型ユビキノール-10 (Q10H2) の同時決定の方法は、最近公開された方法 (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chromatogr. A, 1175, 242-248) に基づいて、LC-MS/MS を陽イオンモードエレクトロスプレーイオン化 (ESI) と共に使用することによって行った。Q10 および Q10H2 の両方の高選択的同定および高感受性定量は、他の選択された脂質の同定と共に可能である。100 μ M Q10 によって処置された SK-MEL-28

からのミトコンドリア濃縮試料の一定分量に、タンパク質沈殿（1-プロパノール300 μ l中で超音波処理された充填細胞100 μ l）、液液抽出（上清に水100 μ lを添加して、X3をn-ヘキサン200 μ lで抽出する）、合せたヘキサン抽出物の蒸発乾固および95:5 メタノール/ヘキサン（v/v）50 μ lでの再構成に基づく、慣習的な前処置に供した。分析は、Prism RP 1 $\times$ 100mm、5 μ m粒径カラムを備えたWaters Quattro II 3連4重極質量分析計（Keystone Scientific）でのLC-MS/MSによった。流速50 μ l/分での20%イソプロピルアルコール80%メタノール中の4mM酸アンモニウムによる定組成溶離。各試料10 μ lを注入した。MRM分析は、m/z 882.7>197.00（Q10H2）およびm/z 880.80>197.00（Q10）トランジションをコーン電圧40 および衝突エネルギー30と共に使用して遂行した。

10

【0361】

実施例3：CoQ10に対する株化細胞の感受性

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

20

【0362】

PaCa2細胞は、50 μ M Q10および100 μ M Q10によりQ10適用の24時間後に、早期および後期アポトーシス細胞の両方で上昇を示した（ゲート細胞の5~10%の間）。PC-3細胞も、50 μ Mおよび100 μ M Q10によって早期および後期アポトーシス集団で上昇を示したが、上昇はPaCa2細胞と比較して小さかった。MCF-7およびSK-MEL28細胞は50 μ Mおよび100 μ M Q10によって、早期アポトーシス集団のみで上昇を示した。HepG2細胞も50 μ M Q10処置に感受性であり、後期アポトーシスステージおよび早期アポトーシスステージに集まったゲート細胞の約20%の上昇があった。SKBr3は、50 μ Mまたは100 μ M Q10処置のどちらによっても早期および後期アポトーシスで大きな上昇を少しも示さなかった、試験した中で唯一の株化細胞であった。結果を図1~6に示す。

30

【0363】

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

40

【0364】

実施例4：Q10によって処置した細胞のプロテオミクス分析

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

【0365】

Q10によって処置したSKMEL-28細胞のプロテオミクス分析

50

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

【0366】

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

【0367】

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

【表2】

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

時間 (時)	Q10濃度 (μ M)	2次元 スポット数	発現	差	タンパク質	名称	種類
3	50	528	低下	1.234	カテプシンD	CTSD	ペプチダーゼ
3	50	702	低下	1.575	TCP1含有シャペロニン、サブユニット3	CCT3	その他
3	50	74	低下	1.383	真核生物翻訳開始因子3	EIF3G	翻訳調節因子
3	50	829	低下	1.074	リボソームタンパク質P2	RPLP2	その他
3	50	368	低下	1.121	トランスアルドラーゼ1	TALDO1	酵素
6	50	452	上昇	-1.464	真核生物翻訳開始因子6	EIF6	翻訳調節因子
6	50	175	上昇	-1.32	ストマチン;HSPC322	STOM	その他
6	50	827	上昇	-1.457	チロシン3/トリプトファン5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質	YWHAZ	酵素
6	50	139	上昇	-1.628	ビメンチン	VIM	その他
6	50	218	上昇	-1.416	ビメンチン	VIM	その他
6	50	218	上昇	-1.212	ビメンチン	VIM	その他
6	50	139	上昇	-1.036	ビメンチン	VIM	その他
6	50	507	低下	1.379	ラミンB1	LMNB1	その他
6	50	571	低下	1.832	ミトコンドリアインポート受容体Tom22	TOMM22	トランスポータ
12	50	166	上昇	-1.171	ALG-2共役タンパク質1	PDCD6IP	その他
12	50	550	上昇	-1.747	ペプチジルプロリルイソメラーゼ A	PPIA	酵素
12	50	613	低下	1.802	ガラクトシナーゼ1	LGALS1	その他
12	50	242	低下	1.373	ホスホグリセリン酸ムターゼ;ホスホマンノムターゼ2	PGAM2	ホスファターゼ
24	50	326	低下	1.385	グリシール-tRNAシンターゼ	GARS	酵素
24	50	419	低下	1.451	マゴナシホモログ	MAGOH	その他
3	100	528	低下	-1.036	カテプシンD	CTSD	ペプチダーゼ
3	100	702	低下	1.151	TCP1含有シャペロニン、サブユニット3	CCT3	その他
3	100	74	低下	1.122	真核生物翻訳開始因子3	EIF3G	翻訳調節因子
3	100	829	低下	1.145	リボソームタンパク質P2	RPLP2	その他
3	100	368	低下	1.209	トランスアルドラーゼ1	TALDO1	酵素
6	100	139	上昇	-1.829	ビメンチン	VIM	その他
6	100	218	上昇	-1.761	ビメンチン	VIM	その他
6	100	452	低下	1.134	真核生物翻訳開始因子6	EIF6	翻訳調節因子
6	100	252	低下	1.4	Sec 13タンパク質、ケラチンII	?	
6	100	827	低下	1.12	チロシン3/トリプトファン5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質	YWHAZ	酵素
12	100	76	上昇	-1.679	ガラクトシナーゼ1;ケラチンII	LGALS1	その他

【0368】

本実験の主要な発見は、トランスアルドラーゼ1の減少であり、このことはQ10が癌細胞内の代謝状態を改変することにより作用するという前提を裏付けた。トランスアルドラーゼ1は、ペントースリン酸経路(ヘキソースモノリン酸分路としても公知)中の酵素である。トランスアルドラーゼ(EC:2.2.1.2)は、3炭素ケトールユニットのセドヘプツロース7-リン酸からグリセルアルデヒド3-リン酸への可逆的移動を触媒して、エリトロース4-リン酸およびフルクトース6-リン酸を形成する。本酵素は、トランスケトラーゼと共に、解糖経路とペントースリン酸経路との間に連結を提供する。こ

のことはヌクレオチドおよびNADPH合成に関連しており、生合成反応のための還元等価物の産生および還元環境の維持を容易にする。

【0369】

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

10

【0370】

これらの初期の結果から、SK-MEL-28細胞中でQ10によって調節されているような、2次元ゲル電気泳動によって同定された残りのタンパク質を公知の関係について分析した (図9)。これらのタンパク質の機能性評価は、14-3-3-媒介シグナル伝達に参与する群 (PDCP6IP、YWHAZ、およびVIM) が、多種多様のプロセス [細胞周期; ペントースリン酸経路 (TALDO1); セラミドシグナル伝達 (CTSD); アミノアシル-tRNA生合成 (GARS)、およびミトコンドリアタンパク質インポート (TOM22)] に結び付けられた個別のタンパク質と共にあることを明らかにした。

【0371】

20

Q10によって処置したSCC細胞のプロテオミクス分析

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

【0372】

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

30

【表 3】

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

スポット数	タンパク質	名称	細胞局在	機能	応答 (倍率変化)
331	トランスアルドラーゼ 1	TALDO1	細胞質	酵素	6 および 14 時間にて低下 (1.5)
23	ヒト BSCv (染色体 20 読み枠 3)	C20ORF3	原形質膜	ストリクトシジンシンターゼ	6 および 24 時間にて低下 (2.1)
54	NM23 タンパク質	NME1	核、(ミトコンドリア?)	キナーゼ	6 時間にて上昇 (-1.2)、24 時間にて低下
116	MCF7 乳癌株化細胞からの 2 つのヒト EST (HSP70)			HSP70	6 時間にて低下 (2.6)、24 時間にてさらに低下
176	熱ショック 27 kDa タンパク質 1	HSPB1	細胞質	環境ストレスに対する応答	6 および 24 時間にて上昇 (-1.9)
135	ケラチン I	KRT1	細胞質	中間フィラメント	6 および 24 時間にて低下 (2.3)
50	ケラチン 14	KRT14	細胞質	中間フィラメント	6 および 24 時間にて上昇 (-1.6)
68	ケラチン 13	KRT13	細胞質	中間フィラメント	6 および 24 時間にて上昇 (-1.5)
49	プロテアソームベータ 7	PSMB7	細胞質	プロテアソームサブユニット	24 時間にてのみ低下 (1.6)
93	プロテアソーム・アクチベーター・サブユニット 3	PSME3	細胞質	ペプチダーゼ	24 時間にてのみ低下 (1.3)
66	Rho GDP 解離阻害剤 (GDI) アルファ	ARHGDIA	細胞質	阻害剤	6 時間にてのみ低下 (1.5)
1	不明?				低下 (9.5)

【0373】

トランスアルドラーゼ 1: Q10 で処置した SKMEL-28 細胞で先に観察されたように、酵素トランスアルドラーゼ 1 はレベルの低下によって調節された。これは、Q10 とトランスアルドラーゼの改変（およびそれゆえ細胞の代謝状態）との連関についての以前の観察結果を独立して確認するものである。

【0374】

トランスアルドラーゼは、ペントースリン酸経路の非酸化的段階における酵素である（図 10）。ペントースリン酸経路は、還元的生合成のためのニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（還元型 NADH）の発生のための細胞の代謝状態において、ならびに ATP、DNA、および RNA の必須構成要素であるリボースの形成において重要である。トランスアルドラーゼはまた、ペントースリン酸経路を解糖に連結する。解糖は、酸化的リン酸化のミトコンドリアプロセスが利用されないため、癌細胞が細胞生存に必要なエネルギーを取得する代謝経路である。Q10 は、酸化的リン酸化およびミトコンドリア ATP 産生に必要とされる必須のコエンザイム因子である。

【0375】

BSCv: スポット 23 は、BSCv という名称の、染色体 20 からの新規ヒトタンパク質であった。BSCv タンパク質は、脂肪細胞血漿膜結合型タンパク質（遺伝子名: APMA P または C20orf3）としても公知であり、タンパク質のストリクトシジン・シンターゼ・ファミリーに配列類似性を有するシングルパス II 型膜タンパク質であることが予測されている。Q10 処置は、本タンパク質のレベルの低下を引き起こした。本タンパク質は、十分に特徴付けもされておらず、ストリクトシジンシンターゼとのその相同性も確認されてもいない。興味深いことに、本タンパク質は脂肪細胞分化の役割に関連してきた (Albrekt sen et al., 2001)。ヒト大網脂肪組織の最近の

プロテオミクス研究はBSCvを、病的肥満女性による多嚢胞性 (polycystic) 卵巣症候群 (PCOS) の差次的発現を有する9種類のタンパク質のうちの1つとして同定した (Corton, 2008 Hum. Reprod. 23: 651-661に概説されている)。Q10に应答する細胞表面タンパク質としてのBSCvに対する抗体は、バイオマーカーとして有用であろう。現在の結果および入手可能な文献に基づいて、BSCvは癌および糖尿病で潜在的な役割を有し得る。

【0376】

NM23A: 非転移性細胞1タンパク質 (NM23A、NME1としても公知) は、転移サプレッサーとで考えられる。本遺伝子 (NME1) は、高転移性細胞におけるその低下したmRNA転写レベルのために同定された。該タンパク質は、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ (NDK) としての活性を有し、「A」アイソフォーム (本遺伝子によりコードされた) および「B」アイソフォーム (NME2によりコードされた) で構成されたヘキサマーとして存在する。本遺伝子における突然変異は、侵襲性神経芽細胞腫において同定されている。NDK活性は、例えばクエン酸 (クレブス) 回路で産生されたGTPがATPに変換されるときなどに、異なるヌクレオシド3リン酸の濃度の間で平衡を維持する。NDK複合体は、STRAPとの相互作用を通じてp53に関連している。STRAPがHNF4Aに連結されていることは注目に値する。それゆえNM23Aは、細胞制御および疾患処置に重要な経路に参与する潜在的タンパク質である。

【0377】

Rho GDP解離阻害剤 (GDI) アルファ: GDIは、Rhoタンパク質からのGDPの解離、および続いてのRhoタンパク質へのGTPの結合を阻害することによって、RhoタンパクのGDP/GTP交換反応を調節する。該タンパク質は、癌細胞において上方調節される。

【0378】

実施例5: ミトコンドリア濃縮分析

複数の一連の証拠は、ミトコンドリアタンパク質の役割および癌生物学およびQ10应答のより綿密な評価が正当化されることを示唆した。第1に、正常細胞におけるエネルギー産生のためのミトコンドリア酸化的リン酸化プロセスには、Q10の不可欠の役割がある。しかし、癌細胞に出現するのは、Q10を必要としない解糖の代わりの経路によるエネルギー産生への代謝シフトである。第2に、細胞のアポトーシス応答は、ミトコンドリアタンパク質の出現を必要とする。Q10は、癌細胞における刺激アポトーシスとして樹立されてきた (Bcl-2ファミリータンパク質、シトクロムc)。最後に、ミトコンドリアインポート受容体タンパク質TOM22のタンパク質レベルの調節によって例示されるように (本明細書に記載する実験を参照)、新たなミトコンドリアタンパク質がQ10処置によって調節されていることが同定された。

【0379】

ミトコンドリア濃縮試料の産生

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

【0380】

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

2次元ゲル電気泳動は、100 μ M Q10によって6、19、および48時間処置されたSK-MEL-28ミトコンドリア濃縮試料に2個の一定分量から溶解されたタンパ

10

20

30

40

50

ク質に対して（対応する偽ビヒクル対照と共に）遂行した。試料に2次元電気泳動に供した（2通り）。525個のタンパク質スポットの分析を遂行して、対照試料を残りの時点の試料に対して比較した（図11）。

【0381】

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

【表4】

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

スポット数	タンパク質	名称	機能	応答（倍率変化）
11	不明のタンパク質	?	?	6時間にて上昇（1.3）、この後、低レベルまで降下
131	不明、スポット数11と同様、修飾	?	?	6時間にて低下（1.3）、19および48時間ではさらに降下
279	アシル-CoAチオエステラーゼ7アイソフォームhBACHb	ACOT7	脂肪アシル-CoAを遊離脂肪酸およびCoAに切断する	6時間にて低下（1.3）、48時間にて正常に戻る
372	ピルビン酸キナーゼ	PKM2	ピルビン酸およびATPからのホスホエノールピルビン酸の産生を触媒する	6時間にて上昇（1.5）、48時間にて正常に戻る
110	ER60タンパク質	PDIA3	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ	19および48時間にて上昇
185	ケラチン10	KRT10	中間フィラメント	19時間にてのみ上昇
202	ベータアクチン		構造タンパク質	19時間にてのみ上昇
246	マレクチン	MLEC	小胞体の炭水化物結合タンパク質およびタンパク質N-グリコシル化の早期ステップにおける候補プレイヤー	19時間にてのみ上昇
75	58を含有するコイル化コイルドメイン	CCDC58	保存された仮想的タンパク質核孔形成	48時間にて上昇

【0382】

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

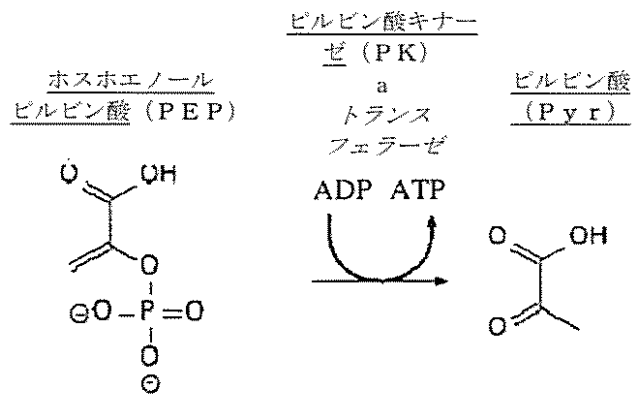
【0383】

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

【0384】

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

【化 3】



10

【0385】

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

【0386】

ミトコンドリアにおけるQ10レベルの定量

20

コエンザイムQ10 (Q10) および還元型ユビキノール-10 (QH2) の同時決定の方法は、最近公開された方法 (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chromatogr. A, 1175, 242-248) に基づいて、LC-MS/MSを陽イオンモードエレクトロスプレーイオン化 (ESI) と共に使用することによって実行した。Q10およびQH2の両方の高選択的同定および高感受性定量は、他の選択された脂質の同定と共に可能である。100 μM Q10によって処置されたSK-MEL-28からのミトコンドリア濃縮試料の一定分量に、タンパク質沈殿、液液抽出、合せたヘキサン抽出物の蒸発乾固および95:5 メタノール/ヘキサン (v/v) での再構成に基づく、慣習的な前処置に供した。

【0387】

30

本分析において、Q10、QH2、およびQ9を定量した (表5)。関連する分子Q9のレベルは低く、検出レベル付近であった。未処置試料のレベルは、この同じレベルを有する6時間Q10処置試料と比較的一致していた。全材料の試料分散を制御するために、コレステロールのレベルも測定して、差が試料サイズ誤差によるものでないことを確認した。Q10レベルが同じミトコンドリア調製物の他の一定分量のタンパク質抽出によって取得された全タンパク質値に対して補正されたときに、相対比は比較可能であった。それゆえQ10レベルの著しい上昇が19時間後に得られ (約3倍)、48時間時点までになお大きな上昇 (約6倍) が得られた (図12)。

【表 5】

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

ファイル	試料	注入	ピーク面積		ng/試料			$\mu\text{g}/\text{試料}$ コレステロール
			Q9	Q10	Q9	Q10	Q10H ₂	
081204-05	100ng標準	10%	245, 342	352792				
081204-06	6時間モック番号1	5 μl	2560	32649	1.04	9.25		
051204-07	溶媒ブランク番号1	5 μl	3781	3174	1.54	0.9		
081204-08	溶媒ブランク番号2	20%	2396	4399	0.98	1.25		
081204-09	6時間モック番号2	10 μl	1572	36328	0.64	10.3		
081204-10	溶媒ブランク番号3	20%	1722	2504	0.7	0.71		
081204-11	48時間Q10処置	20%	4879	164496	1.99	46.63	0.28	13.86
081204-12	48時間モック	20%	2412	25552	0.98	7.24	0.09	13.04
081204-13	6時間Q10処置	20%	692	25427	0.28	7.21		
081204-14	19時間Q10処置	20%	1161	59164	0.47	16.77		
081204-15	19時間モック	20%	901	19999	0.37	5.67		

10

【0388】

本試験からの驚くべき結果は、Q10 が酸化型として細胞に供給されるという発見であった。48 時間試料では、還元型 Q10H₂ も測定され、著しく低い量で存在することが見出された (CoQ10 46.63 ng/試料と比較して、CoQ10H₂ 0.28 ng/試料)。Q10 処置 48 時間試料において Q10H₂ のレベルの一般的な上昇 (3 20 倍) があったが、レベルはアッセイの推定検出限界付近であった。興味深いことに、酸化型 (Q10) は、生物系において酸化エンハンサとして作用することができる。文献によれば、ヒト血漿を Q10 および Q10H₂ を評価したとき、分子の大部分 (90%) は、抗酸化剤として作用することができる、Q10H₂ の還元型で見出された (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma A, 1175, 242-248)。

【0389】

それゆえこれらの結果は、培地への Q10 の外部からの添加時に Q10 のレベルがミトコンドリア中で上昇することを確認および定量する。驚くべきおよび予想外の発見は、Q10 がいずれの著しい量でも供給された酸化型 (酸化促進) で維持されて、Q10H₂ の還元 (抗酸化) 型に変化されないことであった。 30

【0390】

実施例 6: リアルタイム PCR アレイ

実験 1: アポトーシスアレイ

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

【0391】

それゆえ PCR アレイをスクリーニングツールとして使用して、細胞内の Q10 の生物学的作用の様式への洞察を潜在的に供給する一連の分子ターゲットを評価した。80 の経路特異的ターゲットを含有する事前に選択されたサブセットの mRNA レベルを影響評価するためのリアルタイム PCR 定量を使用して、mRNA の変化を評価した。 40

【0392】

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

【0393】

50

50 μ m Q10によって24時間処置したSkBr-3細胞

RT-PCRのアッセイ方法を利用して、合計84のアポトーシス経路関連タンパク質に対するmRNAレベルの変化の尺度を提供した。Q10（24時間）を用いた、SkBr-3に対するリアルタイムPCRアポトーシス分析による実験は、以下のmRNA：Bcl2、Bcl2L1、Bcl2L11、Bircl6、Bax、XIap、Hprt1、Apaf1、Abl1、Brafが影響されていることを同定した。これらの結果は再度、Q10処置に対する癌細胞のアポトーシス応答を裏付ける証拠を提供した。

【表6A】

表6A

記号	上方-下方調節	ユニジェン	参照配列	内容	G名称
BCL2L1	13.1957	Hs.5169 66	NM_1385 78	BCL2様1	BCL-XL/S
BNIP2	6.3291	Hs.6464 90	NM_0043 30	BCL2/アデノウイルスE 1B 19kDa 共役タンパ ク質2	BNIP-2/NIP2
BCL2	5.4717	Hs.1507 49	NM_0006 33	B細胞 CLL/リンパ腫2	Bcl-2
BIRC6	4.7966	Hs.1501 07	NM_0162 52	バキュロウイルスIAPリビ ート含有6（アポロン）	アポロン/ブルース
BCL2L11	4.6012	Hs.4696 58	NM_0065 38	BCL2様11（アポトーシ ス促進物質）	BAM/BIM
XIAP	4.3832	Hs.3560 76	NM_0011 67	アポトーシスのX連結阻害剤	API3/BIRC4
BRAF	4.3832	Hs.5500 61	NM_0043 33	V-r a fマウス肉腫ウイル ス癌遺伝子ホモログB1	B-r a f 1 /BRA F1
BAX	3.896	Hs.6315 46	NM_0043 24	BCL2関連Xタンパク質	Baxゼータ
APAF1	2.6244	Hs.7081 12	NM_0011 60	アポトーシスベプチダーゼ活 性化因子	CED4/DKFP 781B1145
HPRT1	160.6748	Hs.4127 07	NM_0001 94	ヒポキサンチンホスホリボシ ルトランスフェラーゼ1（レ ッシューナイハン症候群）	HGPRT/HPRT

【0394】

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

【表 6 B】

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

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

【0395】

HRK	ハラキリ、BCL2 共役タンパク質 (BH3ドメインのみを含有する)	48時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス促進性
PYCARD	PYDおよびCARDドメイン含有	6時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス・プロテアーゼ・アクチベーター
TNF	腫瘍壊死因子 (TNFスーパーファミリー、メンバー2)	48時間にて上方調節、次に下方調節	細胞外空間	TNF受容体結合
TNFRSF10A	腫瘍壊死因子 受容体スーパーファミリー、メンバー10a	48時間にて上方調節、次に下方調節	原形質膜	カスパーゼ活性化因子
TNFRSF10B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b	72時間にて下方調節	原形質膜	p53シグナル伝達、カスパーゼ活性化
TNFRSF1A	腫瘍壊死因子 受容体スーパーファミリー、メンバー1A	72時間にて下方調節	原形質膜	アポトーシス促進性
TNFRSF21	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー21	48時間にて下方調節	原形質膜	カスパーゼを活性化する
CD27	CD27分子	48時間にて下方調節	原形質膜	カスパーゼ阻害剤
TNFRSF9	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9	48時間にて下方調節	原形質膜	アポトーシス促進性
TNFSF10	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリー、メンバー10	48時間にて上方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
TP73	腫瘍タンパク質 p73	48時間にて下方調節	核	転写因子
TRAF3	TNF受容体関連因子3	48時間にて下方調節	細胞質	ジンクフィンガードメイン
TRAF4	TNF受容体関連因子4	48時間にて下方調節	細胞質	ジンクフィンガードメイン

10

20

30

【表 7】

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

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

【表 8】

表 8. SK-MEL-28 細胞および SCC 細胞の両方において $100\mu\text{M}$ Q10 処置によって調節されたアポトーシスアレイからの遺伝子

記号	内容
BCL2	B 細胞 CLL / リンパ腫 2
BCL2L1	BCL2 様 1 (Bcl-x1)
BIRC3	バキュロウイルス IAP リピート含有 3
FADD	デスドメインを介した Fas (TNFRSF6) 関連
GADD45A	増殖停止および DNA 損傷誘導性、アルファ
TNFRSF21	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 21
CD27	CD27 分子
TNFRSF9	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 9
TNFSF10	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリー、メンバー 10
TP73	腫瘍タンパク質 p73
TRAF2	TNF 受容体関連因子 2

【0396】

興味深いことに、改変された mRNA レベルは、一連のアポトーシスタンパク質において著しい上方調節を示し、Bcl-x1 は最も高いものの 1 つであった。これは SK-M

10

20

30

40

50

EL-28細胞に対するタンパク質アレイ実験でも観察された。

【0397】

Bcl-x1は、ミトコンドリア中の膜貫通分子である（Bcl-x1は「基底細胞リンパ腫-特大」を表す）。Bcl-x1は、FAS-Lのシグナル伝達経路に関与し、タンパク質のBcl-2ファミリーのメンバーである複数の抗アポトーシスタンパク質の1つである。Bcl-x1は、癌細胞の生存に関わってきた。しかし、ヒトBcl-x mRNAの選択的スプライシングが少なくとも2種類の別個のBcl-x mRNA種、Bcl-xLおよびBcl-xSを生じ得ることが公知である。優勢なタンパク質生成物（233アミノ酸）は、成長因子除去時に細胞死を阻害する、より大型のBcl-x mRNAであるBcl-xLである（Boise et al., 1993. Cell 74, 597-608）。他方では、Bcl-xSは、Bcl-2が細胞死を阻害する能力を阻害して、細胞をアポトーシス細胞死に対して感受性にする。利用した使用アッセイは、どのBcl-xのアイソフォームが上方調節されているかを識別しない。これらの研究でCQによって上方調節されているBcl-xアイソフォームは、当分野で公知の所定の方法によって、例えばRT-PCR方法を使用することによって決定され、2種類のmRNAスプライシングアイソフォームの比（Bcl-xL対Bcl-sL）が評価され得る。

10

【0398】

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

20

【0399】

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

【0400】

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

30

【0401】

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

【0402】

SKMEL-28細胞

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

40

【0403】

アポトーシス応答の早期マーカーは、カスパーゼ3/7タンパク質によるアポトーシスの以前の観察結果と一致する、カスパーゼ9の上方調節（16時間）によって観察される。ストレスシグナル伝達経路の誘導は、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出およ

50

びapaf-1（アポトソーム）の活性化を引き起こし、次にカスパーゼ-9のプロ酵素を切断して活性型とする。いったん開始されると、カスパーゼ-9はプロカスパーゼ-3およびプロカスパーゼ-7の切断を進めて、追加のアポトーシス経路を始動させる。

【表9】

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

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

【0404】

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

【0405】

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

10

20

30

40

50

質であり得るが、関連する p 5 3 タンパク質とは異なる機構を包含し得ることである。

【0406】

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

Q10 応答に関与するタンパク質を同定するために、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法を用いて、酸化ストレスおよび抗酸化防御にターゲットされた経路アレイに関与する遺伝子／タンパク質についての mRNA のレベルの変化を同定した。

【0407】

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

【表 10】

表 10. 酸化ストレスおよび抗酸化防御アレイで見られるような $100 \mu\text{M}$ Q10 処置によって調節された SK-MEL-28 細胞の遺伝子

記号	内容	調節	局在	考えられる機能
ALB	アルブミン	48 時間にて下方調節	細胞外空間	担体タンパク質、抗アポトーシス性
AOX1	アルデヒドオキシダーゼ 1	16 時間から上方調節	細胞質	フリーラジカルを産生する、薬物代謝プロセス。
APOE	アポリポタンパク質 E	48 時間にて下方調節	細胞外空間	脂質代謝
ATOX1	ATX1 抗酸化タンパク質 1 ホモログ (酵母)	48 時間にて下方調節	細胞質	銅代謝
BNIP3	BCL3/アデノウイルス E1B 19 kDa 共役タンパク質 2	48 時間にて下方調節	細胞質	抗アポトーシス性
CSDE1	低温ショックドメイン含有 E1, RNA 結合	48 時間にて下方調節	細胞質	転写調節
CYBA	シトクロム b-245, アルファポリペプチド	48 時間にて下方調節	細胞質	アポトーシス性、
CYGB	シトグロビン	48 時間にて下方調節	細胞質	ベルオキシダーゼ、トランスポート
DHCR24	24-デヒドロコレステロールレダクターゼ	6 時間にて下方調節	細胞質	電子担体は、アポトーシスに関与する TP53 に結合する
DUOX1	デュアルオキシダーゼ 1	48 時間にて上方調節	原形質膜	カルシウムイオン結合、電子担体
DUOX2	デュアルオキシダーゼ 2	48 時間にて下方調節	不明	カルシウムイオン結合
EPHX2	エポキシドヒドロラーゼ 2、細胞質	48 時間にて下方調節	細胞質	アラキドン酸代謝
EPX	好酸球ベルオキシダーゼ	48 時間にて下方調節	細胞質	フェニルアラニン代謝、アポトーシス
GPX2	グルタチオンベルオキシダーゼ 2 (胃腸)	48 時間にて下方調節	細胞質	電子担体は、アポトーシスに関与する TP53 に結合する
GPX3	グルタチオンベルオキシダーゼ 3 (血漿)	48 時間にて上方調節	細胞外空間	アラキドン酸代謝、癌腫において上方調節
GPX5	グルタチオンベルオキシダーゼ 5 (エピジマルアンドロゲン関連タンパク質)	48 時間にて上方調節	細胞外空間	アラキドン酸代謝
GPX6	グルタチオンベルオキシダーゼ 6 (嗅覚)	48 時間にて下方調節	細胞外空間	アラキドン酸代謝
GSR	グルタチオンレダクターゼ	48 時間にて下方調節	細胞質	グルタメートおよびグルタチオン代謝、アポトーシス
GTF2I	基本転写因子 11、i	6 時間にて下方調節	核	転写アクチベーター、fos の転写
KRT1	ケラチン 1 (表皮溶解性角化症)	48 時間にて上方調節	細胞質	糖結合
LPO	ラクトベルオキシダーゼ	48 時間にて下方調節	細胞外空間	フェニルアラニン代謝
MBL2	マンノース結合レクチン (タンパク質 C) 2、可溶性 (オプソニン欠損)	48 時間にて下方調節	細胞外空間	補体シグナル伝達、受容体におけるパターン認識
MGST3	ミクロソームグルタチオン S-トランスフェラーゼ 3	16 時間にて上方調節	細胞質	異物代謝
MPO	ミエロベルオキシダーゼ	48 時間にて下方調節	細胞質	抗アポトーシス性、フェニルアラニン代謝
MPV17	MpV17 ミトコンドリア内膜タンパク質	6 時間にて下方調節	細胞質	ミトコンドリア DNA の維持
MT3	メタロチオネイン 3	48 時間にて下方調節	細胞質	銅イオン結合
NCF1	好中球サイトゾル因子 1、(慢性肉芽腫性疾患、常染色体 1)	6 時間から下方調節	細胞質 (Cytoplasm)	遊離ラジカルを産生する
NCF2	好中球サイトゾル因子 2 (65 kDa、慢性肉芽腫性疾患、常染色体 2)	48 時間にて上方調節	細胞質	電子担体
NME5	非転移性細胞 5、(スクレオシド-2 リン酸キナーゼ) にて発現されたタンパク質	48 時間にて下方調節	不明	キナーゼ、プリンおよびピリミジン代謝
NOS2A	1 酸化窒素シンターゼ 2A (誘導性、肝細胞)	48 時間にて下方調節	細胞質	グルココルチコイド受容体シグナル伝達、アポトーシス
OXR1	酸化抵抗 1	48 時間にて下方調節	細胞質	酸化ストレスに応答する
PDLIM1	PDZ および LIM ドメイン 1 (エルフィン)	48 時間にて上方調節	細胞質	転写アクチベーター
PIP3-E	ホスホイノシチド結合タンパク質 PIP3-E	48 時間にて下方調節	細胞質	ベルオキシダーゼ

【0408】

PRDX2	ペルオキシレドキシン2	6時間にて下方調節	細胞質	フェニルアラニン代謝における役割細胞死における役割
PRDX4	ペルオキシレドキシン4	24時間から下方調節	細胞質	チオレドキシンペルオキシダーゼ
PREX1	ホスファチジルイノシトール3、4、5-3リン酸依存性RAC交換因子1	48時間にて下方調節	細胞質	酸素遊離ラジカルを形成する
PRG3	プロテオグリカン3	48時間にて下方調節	細胞外空間	細胞死における役割
PTGS1	プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ1(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	48時間にて下方調節	細胞質	アラキドン酸代謝、プロスタグランジン合成
PTGS2	プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ2(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	48時間にて上方調節	細胞質	アラキドン酸代謝、プロスタグランジン合成
PXDN	ペルオキシダシンホモログ(ショウジョウバエ)	48時間にて上方調節	不明	TRAF4に結合、カルシウムイオン結合、鉄イオン結合
PXN1	ペルオキシダシンホモログ(ショウジョウバエ) 様	48時間にて下方調節	不明	ペルオキシダーゼ、カルシウムイオン結合、鉄イオン結合
RNF7	リングフィンガータンパク質7	16時間にて上方調節	核	アポトーシス性、銅イオン結合、ユビキチン経路
SGK2	血清/グルココルチコイド調節キナーゼ2	48時間にて下方調節	細胞質	キナーゼ、カリウムチャネル調節因子
SIRT2	サーチュイン(サイレント接合型情報調節2ホモログ) 2 (出芽酵母)	16時間にて上方調節	核	転写因子
SOD1	スーパーオキシドディスムターゼ1、可溶性(筋萎縮性側索硬化症1(成人))	16時間にて上方調節	細胞質	アポトーシス性、カスパーゼアクチベーター
SOD2	スーパーオキシドディスムターゼ2、ミトコンドリア	16時間にて上方調節	細胞質	アポトーシス性、TNFにより調節
SOD3	スーパーオキシドディスムターゼ3、細胞外	48時間にて下方調節	細胞外空間	アポトーシス促進性
SRXN1	スルフィレドキシン1ホモログ(出芽酵母)	48時間にて下方調節	細胞質	DNA結合、オキシドレダクターゼ
TPO	甲状腺ペルオキシダーゼ	48時間にて下方調節	原形質膜	サイログロブリンのヨウ素化、チロシン代謝、フェニルアラニン代謝
TTN	タイチン	48時間にて下方調節	細胞質	アクチン細胞骨格シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達
TXNDC2	チオレドキシンドメイン含有2(精子)	48時間にて下方調節	細胞質	ピリミジン代謝

10

20

【0409】

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

30

【0410】

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

【0411】

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

40

1つのRhoGuanosin三リン酸ホスファターゼ(GTPアーゼ)、通常Rac1またはRac2(Racは、Rho関連C3ボツリヌス毒素基質を表す)

5つの「phox」ユニット(Phoxは、食細胞オキシダーゼを表す。)

・P91-PHOX(ヘムを含有する)

p22phox

p40phox

p47phox(NCF1)

p67phox(NCF2)

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

50

PHオキシダーゼである、NOX5である。

【0412】

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

【0413】

第2の主な早期誘導タンパク質は、1酸化窒素シンターゼ2A (誘導性、肝細胞) (NOS2A) であった。1酸化窒素は、神経伝達ならびに抗菌および抗腫瘍活性を含む複数のプロセスにおいて、生物学的媒介物として作用する反応性遊離ラジカルである。本遺伝子は、肝臓で発現され、リポ多糖類およびあるサイトカインの併用によって誘導可能である1酸化窒素シンターゼをコードする。

【0414】

スーパーオキシドディスムターゼ2、ミトコンドリア (SOD2) は、鉄/マンガンスーパーオキシドディスムターゼファミリーのメンバーである。これはホモテトラマーを形成し、サブユニットに付きマンガンイオン1個を結合するミトコンドリアタンパク質をコードする。本タンパク質は、酸化的リン酸化のスーパーオキシド副生成物に結合して、これらを過酸化水素および2原子酸素に変換する。本遺伝子の突然変異は、関連する特発性心筋症 (IDC)、早期老化、散発性運動ニューロン疾患、および癌に関連してきた。

【0415】

下方調節されたタンパク質の例は、内因性FOX M1発現がS期およびG2/M期にピークに達する細胞周期進行で主要な役割を果たすことが公知である、フォークヘッドボックスM1 (FOX M1) である。最近の研究は、G2/M特異的遺伝子、例えばPlk1、サイクリンB2、Nek2およびCENPFの大型アレイの発現を調節して、染色体分離およびゲノム安定性の維持において重要な役割を果たすことを示している。FOX M1遺伝子は今や、ヒト癌原遺伝子として公知である。FOX M1の異常な上方調節は、基底細胞癌腫 (BCC) の腫瘍形成に関与している。FOX M1上方調節は続いて、肝臓、乳房、肺、前立腺、子宮頸部、結腸、膵臓、および脳を含む、固形ヒト癌の大部分で見出された。BCCおよびQ10によるさらなる研究によってFOX M1レベルを評価すべきである。

【0416】

SKMEL-28細胞

SKMEL-28細胞を使用して、さらなる実験を行った。リアルタイムPCR法 (RT-PCR) を使用して、100 μM Q10によって処置されたSKMEL-28細胞中に存在するmRNAのレベルを未処置細胞のレベルと各種の時点にて比較した。PCRアレイ (SABiosciences) は、経路または疾患に焦点を合せた遺伝子ならびに適切なRNA品質管理のための、96ウェルプレートでの最適化リアルタイムPCRプライマアッセイのセットである。PCRアレイは、リアルタイムPCR感度およびマイクロアレイの多遺伝子プロファイリング能力を有する遺伝子発現分析を実施する。

【表 1 1】

表 1 1 酸化ストレスおよび抗酸化防御 P C R アレイで評価された m R N A レベルのリストおよび分類 SKME L - 2 8 細胞に対する 1 0 0 μ M Q 1 0 による処置の 6 時間後、m R N A レベルの最大の変化は、タンパク質コードを強調することによって示されている（上昇－太字；低下－下線；または変化なし－灰色）。

抗酸化剤：

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

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

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

他の抗酸化剤 : ALB, APOE, GSR, MT3, SELS, SOD1, SOD3, SRXN1, TXNDC2, TXNRD1, TXNRD2.

反応性酸素種 (ROS) 代謝に関与する遺伝子：

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) : SOD1, SOD2, SOD3.

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

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

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

10

20

【表 12】

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

参照配列	記号	内容	6時間 Q10	16時間 Q10	24時間 Q10	48時間 Q10	72時間 Q10
NM_000265	NCF1	好中球サイトゾル因子 1、(慢性肉芽腫性疾患、常染色体 1)	0	高	3.3829	15.7838	31.5369
NM_012423	RPL13A	リボソームタンパク質 L13a	-0.9025	3.1857	2.5492	4.9253	7.82
NM_020820	PREX1	ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-3 リン酸依存性 RAC 交換因子 1	-3.2971	2.867	0.3222	6.3719	7.476
NM_012237	SIRT2	サーチュイン (サイレント接合型情報調節 2 ホモログ) 2 (出芽酵母)	-0.9025	4.0829	4.4766	5.7166	6.6257
NM_005125	CCS	スーパーオキシドジムスターゼの銅シャペロン	-0.6206	3.0077	3.452	2.9801	6.1539
NM_018165	PRDX5	ペルオキシレドキシニン 5	-2.995	3.0454	3.5381	4.7955	6.0169
NM_016276	SGK2	血清/グルココルチコイド調節キナーゼ 2	0	0	0	0.5995	5.937
NM_003551	NME5	非転移性細胞 5、(スクレオシドジリン酸キナーゼ) にて発現されたタンパク質	-0.6652	3.1138	3.3694	3.1549	5.782
NM_004417	DUSP1	2 重特異性ホスファターゼ 1	-0.6998	0.5902	2.7713	3.321	5.5375
NM_001752	CAT	カタラーゼ	-0.8589	2.8424	0.1046	3.8557	5.3988
NM_000041	APOE	アポリポタンパク質 E	0.8212	3.2069	-0.9543	3.7694	5.3315
NM_000101	CYBA	シトクロム b-245、アルファポリペプチド	-0.3945	4.3475	3.9208	6.2452	5.0762
NM_000433	NCF2	好中球サイトゾル因子 2 (65 kDa、慢性肉芽腫性疾患、常染色体 2)	1.2266	3.0077	0.0954	5.476	0
NM_000963	PTGS2	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ 2 (プロスタグランジン G/H シンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	-0.6912	2.7046	2.6552	4.0553	-3.3022
NM_018307	PRNP	プリオンタンパク質 (p27-30) (クロイツフェルト-ヤコブ疾患、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインカー症候群、致死性家族性不眠症)	-0.2144	3.5236	2.9086	5.0837	-3.9396
NM_004052	BCL2P3	BCL2/アデノウイルス E1B 19 kDa 共役タンパク質 3	-2.9376	3.3288	4.312	-18.2069	-4.8424
NM_000242	MBL2	マンノース結合レクチン (タンパク質 C) 2、可溶性 (オプソニン欠損)	-0.3622	-1.9072	-3.0142	-1.1854	-6.4544
NM_021953	FOX M1	フォークヘッドボックス M1	-0.8135	0.068	-0.9216	3.3655	-10.0953

【0417】

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

10

20

30

40

50

【0418】

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

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

・5つの「phox」（食細胞オキシダーゼ）ユニット

P91-PHOX（ヘムを含有する）

p22phox

p40phox

p47phox（NCF1）

p67phox（NCF2）

別のNADPHオキシダーゼレベルが変化しないことに注目される。酵素は、スーパーオキシドを発生して、Ca²⁺依存性方式でH⁺チャネルとして機能する新規NADPHオキシダーゼである、NOX5である。

【0419】

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

【0420】

第2の主な早期誘導タンパク質は、1酸化窒素シンターゼ2A（誘導性、肝細胞）（NOS2A）であった。1酸化窒素は、神経伝達ならびに抗菌および抗腫瘍活性を含む複数のプロセスにおいて、生物学的媒介物として作用する反応性遊離ラジカルである。本遺伝子は、肝臓で発現され、リポ多糖類およびあるサイトカインの併用によって誘導可能である1酸化窒素シンターゼをコードする。

【0421】

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

【0422】

実験3：熱ショックアレイを使用するリアルタイムPCRアレイ

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

【表 1 3】

表 1 3. S C C 細胞において $100 \mu\text{M}$ Q 1 0 処置によって調節された熱ショックタンパク質アレイからの遺伝子

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

10

20

【0423】

実験4：糖尿病アレイを使用するリアルタイムPCRアレイ

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

30

【表 14】

表 14. $100\mu\text{M}$ Q10 によって 16 時間処置された SK-MEL-28 細胞に対する主な mRNA レベルの変化

参照配列	内容	記号	16 時間後の倍率変化 ($100\mu\text{M}$ Q10)
NM_000162	グルコキナーゼ (ヘキソキナーゼ4)	GCK	8.5386
NM_178849	肝細胞核因子4、アルファ	HNF4A	8.421
NM_005249	フォークヘッドボックスG1	FOXG1	4.6396
NM_000599	インスリン様成長因子結合タンパク質5	IGFBP5	2.2721
NM_001101	アクチン、ベータ	ACTB	-2.0936
NM_002863	ホスホリラーゼ、グリコーゲン；肝臓 (エール病、グリコーゲン蓄積病VI型)	PYGL	-2.65
NM_001065	腫瘍壊死因子 受容体スーパーファミリー、メンバー1A	TNFRSF1A	-2.8011
NM_021158	トリプルズ (Tribbles) ホモログ3 (ショウジョウバエ)	TRIB3	-2.8011
NM_003749	インスリン受容体基質2	IRS2	-2.9404
NM_004578	RAB4A、メンバーRAS癌遺伝子ファミリー	RAB4A	-3.1296
NM_004176	ステロール調節要素結合転写因子1	SREBF1	-3.5455
NM_004969	インスリン分解酵素	IDE	-4.4878
NM_005026	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、触媒、デルタポリペプチド	PIK3CD	-6.8971
NM_000208	インスリン受容体	INSR	-8.6099
NM_003376	血管内皮成長因子A	VEGFA	-15.5194
NM_001315	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ14	MAPK14	-74.3366

10

20

【0424】

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

30

【0425】

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

40

【表 15】

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

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

10

20

30

40

【表 16】

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

記号	内容	調節
G6PD	グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	6 時間にて下方調節
ICAM1	細胞間接着分子 1 (CD54)、ヒトライノウイルス受容体	6 時間にて下方調節
INPPL1	イノシトールポリリン酸ホスファターゼ様 1	6 時間にて下方調節
NOS3	1 酸化窒素シンターゼ 3 (内皮細胞)	6 時間にて下方調節
PIK3CD	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、触媒、デルタポリペプチド	6 時間にて下方調節
PPARA	ペルオキシソーム増殖活性化受容体、アルファ	6 時間にて下方調節
PYGL	ホスホリラーゼ、グリコーゲン；肝臓 (エール病、グリコーゲン蓄積病 V1 型)	6 時間にて下方調節
SREBF1	ステロール調節要素結合転写因子 1	6 時間にて下方調節
STXBP2	シンタキシン結合タンパク質 2	6 時間にて下方調節
TNF	腫瘍壊死因子 (TNF スーパーファミリー、メンバー 2)	6 時間にて下方調節
TNFRSF1A	腫瘍壊死因子 受容体スーパーファミリー、メンバー 1A	6 および 24 時間にて下方調節
VEGFA	血管内皮成長因子 A	6 時間にて下方調節

10

【表 17】

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

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

20

【0426】

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

30

【0427】

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

【0428】

肝細胞核因子 4、アルファ (HNF4A)：HNF4 (肝細胞核因子 4) は、肝臓発生に不可欠である肝臓、腸、腎臓、および膵臓ベータ細胞で大部分が発現される核受容体タンパク質である。ヒトにおいては、2 種類の別々の遺伝子 HNF4A および HNF4G によってそれぞれコードされた HNF4 の 2 種類のアイソフォーム、アルファおよびガンマがある (例えば Chartier FL, Bossu JP, Laudet V, Fruchart JC, Laine B (1994). "Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver". Gene 147 (2): 269-72 を参照)。

40

【0429】

HNF4 は当初、オーファン受容体として分類された。しかし HNF4 は後に、多種多

50

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

【0430】

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

【0431】

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

【0432】

HNF4アルファのリガンド結合ドメインの構造において（1M7W. pdb; Dhe-Paganon (2002) JBC, 277, 37973）；小型脂質が観察され、大腸菌産生から同時精製された。結晶はタンパク質の2種類の立体配座を含有し、ここで伸長らせん10および短らせん12が交互の立体配座を有している。脂質結合領域の検査時に、興味深いことに、2つの出口領域があることが見出された。一方の領域は小型脂質の頭基を保持して、複数のポケット領域が本出口ポートと共局在していることが注目される。仮説は、Q10が本転写因子に特異的に結合するということである。本脂質結合トンネ

ル中にモデル化されるとき、Q10環は表面ポケット中に適合するであろう（図28）。公知の機能喪失型突然変異（E276Q）は、本表面ポケットを裏打ちするように残基を配列する潜在能を有し、それゆえ推定上のQ10結合に悪影響を有するであろう。

【0433】

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

【0434】

実施例7：抗体マイクロアレイ分析

10

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

【0435】

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

20

【表 18】

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

名称	比
Cdk1	0.1
DcR1	0.1
タンパク質キナーゼCb2	0.1
腫瘍壊死因子可溶性受容体II	0.1
BAD	0.1
カスパーゼ13	0.2
FBI1パケモン	0.2
ザイキシン	0.2
Cdc25A	0.3
PIASx	0.3
神経成長因子b	0.3
タンパク質チロシンホスファターゼPEST	0.3
hBRM hSNF2a	0.4
GRP94	0.4
カルモジュリン	0.4
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ2Cab	0.4
ARC	0.4
ニューラビンII	0.4
1酸化窒素シンターゼbNOS	0.4
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ1b	0.4

名称	比
熱ショックタンパク質110	0.4
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ1g1	0.4
COXII	0.5
HSP70	0.5
BLK	0.5
サイトケラチン812	0.5
BUBR1	0.5
FOXC2	0.5
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ2ABg	0.5
MSH6	0.5
DR6	0.5
Rad17	0.5
BAF57	0.5
形質転換成長因子b pan	0.5
BTK	0.5
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ2A/B pan2	0.5
CNPアーゼ	0.5
SynCAM	0.5
増殖細胞核抗原	0.5

10

20

【表 19】

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

名称	比	名称	比
Bcl xL	4.2	クラスピン	2.1
BID	3.7	GRP75	2.1
Bmf	3.7	カスパーゼ6	2.1
PUMA bbc3	3.0	ILP2	2.1
Zipキナーゼ	2.8	aアクチニン	2.1
Bmf	2.8	ビトロネクチン	2.1
DcR2	2.7	DRAK1	2.1
E2F1	2.7	PTEN	2.1
FAK pTyr577	2.5	Grb2	2.1
FKHRL1 FOXO3a	2.5	HDAC4	2.0
MTBP	2.5	HDAC7	2.0
コネキシン32	2.5	1酸化窒素シンターゼbNOS	2.0
アネキシンVII	2.4	HDAC2	2.0
p63	2.4	p38 MAPK	2.0
SUMO1	2.4	リーリン	2.0
Iアファディン	2.3	タンパク質キナーゼCd	2.0
MDMX	2.3	cerbB3	2.0
Pyk2	2.3	hSNF5 INI1	2.0
RIP受容体共役タンパク質	2.3	タンパク質キナーゼCa	2.0
RICK	2.3	グルタミン酸受容体NMDAR 2a	2.0
IKKa	2.3	レプチン	2.0
Bcl x	2.3	ジメチルヒストン H3 ジMeLys4	2.0
アファディン	2.2	BID	2.0
増殖細胞 タンパク質 Ki67	2.2	MeCP2	2.0
ヒストン H3 pSer28	2.2	神経成長因子受容体 p75	2.0
CASK LIN2	2.2	ミオシン軽鎖キナーゼ	2.0
セントリン	2.2	cRaf pSer621	2.0
TOM22	2.1	GRP78 BiP	2.0
1酸化窒素シンターゼ内皮eNOS	2.1	cMyc	2.0
タンパク質キナーゼBa	2.1	Raf1	2.0
ラミニン	2.1	MTA2 MTA1L	2.0
ミオシンIb核	2.1	Sir2	2.0
カスパーゼ7	2.1	ATF2 pThr69 71	2.0
MAPキナーゼ2 ERK2	2.1	タンパク質キナーゼC	2.0
KIF17	2.1	タンパク質キナーゼCb2	2.0

【0436】

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

【0437】

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

【0438】

以下は、Q10 (24時間) を用いたSKMEL-28に対する抗体アレイ実験からのレベルの改変を有する同定されたタンパク質の一部である: Bcl-x1、Bmf、BT

K、BLK、cJun (pSer63)、コネキシン32、PUMA bbc3、BID、Par4、cCbl。本初期試験からの主な結論は、予想されたアポトーシス促進タンパク質が改変されたことであった。

【0439】

SK-MEL-28の抗体マイクロアレイ

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

【表20】

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

名称	抗体番号 (Sigma)	SKMEL28 Q10/ SKMEL28 対照	SKMEL28 /HEK a対照	HEK a Q10/ HEK a対照
BclxL	B9429	2.46	1.04	1.83
PUMA bbc3	P4743	2.31	1.14	2.14
Bmf	B1559	2.23	1.12	2.11
Bmf	B1684	2.09	1.13	1.74
cJun pSer63	J2128	1.99	1.14	1.85
BLK	B8928	1.94	1.05	1.51

【0440】

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

【0441】

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

【表 2 1】

表 2 1. 100 μ M Q10 による 24 時間処置後の SCC 細胞においてレベルが上昇したタンパク質

名称	比
PUMA b b c 3	3. 8 1
HDAC 7	3. 2 1
BID	3. 1 2
MTBP	3. 0 0
p 3 8 MAPキナーゼ非活性化	2. 9 3
PKR	2. 8 7
TRAIL	2. 8 6
DR 5	2. 8 6
C d k 3	2. 8 2
Nカドヘリン	2. 7 1
リーリン	2. 6 8
p 3 5 C d k 5調節因子	2. 6 3
HDAC 10	2. 6 0
RAP 1	2. 5 9
PSF	2. 5 6
cMyc	2. 5 5
メチルヒストンH3 MeLys 9	2. 5 4
HDAC 1	2. 5 1
F1A	2. 4 8
ROCK 1	2. 4 5
Bim	2. 4 5
FXR 2	2. 4 4
DEDAF	2. 4 4
DcR 1	2. 4 0
APRIL	2. 4 0
PRMT 1	2. 3 6
Pyk 2 pTy r 5 8 0	2. 3 4
ビトロネクチン	2. 3 3
シナプトポディン	2. 3 2
カスパーゼ13	2. 3 0
シタキシン8	2. 2 9
DR 6	2. 2 9
BLK	2. 2 8
ROCK 2	2. 2 8

名称	比
Sir 2	2. 2 5
DcR 3	2. 2 4
RbAp 4 8 RbAp 4 6	2. 2 1
OGlcNAcトランスフェラーゼ	2. 2 1
GRP 7 8 BiP	2. 2 0
Sin 3A	2. 2 0
p 6 3	2. 2 0
プレセニリン1	2. 1 9
PML	2. 1 8
PAK1pThr 2 1 2	2. 1 7
HDAC 8	2. 1 6
HDAC 6	2. 1 5
1酸化窒素シンターゼ誘導性iNOS	2. 1 5
ニューロフィブロミン	2. 1 5
シタキシン6	2. 1 3
パーキン	2. 1 2
Rad 1 7	2. 1 1
1酸化窒素シンターゼbNOS	2. 1 0
TIS 7	2. 0 9
OP18スタスミン (スタスミン1/癌タンパク質18)	2. 0 8
ホスホー b -カテニン pSer 4 5	2. 0 7
ニューラビンII	2. 0 7
eチューブリン	2. 0 7
PKB pThr 3 0 8	2. 0 7
オルニチンデカルボキシラーゼ	2. 0 7
P 5 3 BP 1	2. 0 6
Pyk 2	2. 0 5
HDAC 5	2. 0 5
コネキシン43	2. 0 5
a 1 シントロフィン	2. 0 4
MRP 1	2. 0 4
cerbB4	2. 0 3
Sニトロソシステイン	2. 0 3
SGK	2. 0 2
Rab 5	2. 0 1
ユビキチンC末端ヒドロラーゼL1	2. 0 1
ミオシンIb核	2. 0 0
Par 4 前立腺アポトーシス応答4	2. 0 0

10

20

30

40

【表 2 2】

表 2 2. 100 μ M Q10 による 24 時間処置後の SCC 細胞においてレベルが減少したタンパク質

名称	比
AP1	0.68
セントリン	0.55
CUGBP1	0.67
シスタチンA	0.69
サイトケラチンCK5	0.60
フィブロネクチン	0.63
g パルビン	0.70
成長因子非依存性1	0.63
神経成長因子b	0.60
プロカスパーゼ8	0.72
Rab7	0.62
Rab9	0.73
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ1g	0.71
セリントレオニンタンパク質ホスファターゼ2A	
Bg	0.73
SKM1	0.70
SLIPR MAG13	0.67
スペクトリンaおよびb	0.70
Spread2	0.66
TRF1	0.74

10

20

【0442】

実施例 8：ウェスタンブロット分析

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

30

【0443】

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

【0444】

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

40

100 μ M Q10 によって処置された試料に、処置後の各種の時間に糖尿病アレイを実行した。実験は本質的に上記のように実施された。Q10 処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表 23 に要約される。これらの結果は、以下の遺伝子が Q10 処理によって調節されることを示した：ABCC8、ACLY、ADRB3、CCL5、CEACAM1、CEBRA、FOXP3、FOXG1、G6PD、GLP1R、GPD1、HNF4A、ICAM1、IGFBP5、INPPL1、IRS2、MAPK14、ME1、NFKB1、PARP1、PIK3C2B、PIK3CD、PPARGC1B、PRKAG2、PTPN1、PYGL、SLC2A4、SNAP25、HNF1B、TNFRSF1A、TRIB3、VAPA、VEGFA、IL4R および IL6。

【表 2 3】

表 2 3 : その発現が $100\mu\text{M}$ Q 1 0 によって調節される糖尿病アレイからの遺伝子および細胞におけるその考えられる機能

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

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

10

20

30

【0445】

実施例 10 : $100\mu\text{M}$ Q 1 0 を用いる膵臓癌細胞 (PaCa2) の処理によって mRNA レベルが調節されるとして同定される血管形成関連遺伝子

処理後の様々な時点において $100\mu\text{M}$ Q 1 0 で処理された試料について血管形成アレイが実行された。実験は本質的に上記のように実施された。Q 1 0 処理の際に調節されることが見いだされた種々の遺伝子が以下の表 2 4 に要約される。これらの結果は、以下の遺伝子が Q 1 0 処理によって調節されることを示した : AKT1、ANGPTL4、ANGPEP、CCL2、CDH4、CXCL1、EDG1、EFNA3、EFNB2、EGF、FGF1、ID3、IL1B、IL8、KDR、NRP1、PECAM1、PROK2、SERPINF1、SPHK1、STAB1、TGFB1、VEGFA、および VEGFB。

40

【表 2 4】

表 2 4 : その発現が $100\ \mu\text{M}$ の Q 1 0 で調節される血管形成アレイ由来の遺伝子と、細胞中でのそれらの考えられる機能のリスト。

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

遺伝子	遺伝子の機能
ANGPTL4	抗血管形成、アポトーシスの負の調節因子、脂質代謝
CDH5	血管成熟、細胞接着、細胞増殖の負の調節因子
FGF1	細胞接着、細胞増殖
AKT1	炭水化物代謝プロセス、グリコーゲン合成プロセス、グルコース代謝プロセス、インスリン受容体シグナル伝達経路、アポトーシス促進性遺伝子産物の活性化、アポトーシス性ミトコンドリア変化
ANPEP	タンパク質分解、多細胞生物発生、細胞分化
CCL2	走化性、抗アポトーシス、JAK-STATカスケード、器官形態形成、ウイルスゲノム複製
CXCL1	走化性、炎症性応答、免疫応答、細胞増殖の負の調節、アクチン細胞骨格組織化および生合成
EDG1	細胞増殖の正の調節、神経インパルスの伝達、細胞接着の調節、神経細胞分化、細胞移動の正の調節、Rasの正の調節
EFNB2	VEGFAによって調節される細胞-細胞神経伝達
EGF	MAPKK活性の活性化、有糸分裂の正の調節、DNA複製
IL1B	糖質コルチコイド刺激に対する応答、アポトーシス、シグナル伝達、細胞-細胞シグナル伝達、細胞増殖の負の調節
IL8	細胞周期停止
KDR	AKTによって調節されるVEGF経路
NRP1	細胞接着、シグナル伝達、細胞-細胞シグナル伝達、細胞増殖、VEGFAによって調節される
PECAM1	細胞接着、TNFによって調節される
PROK2	MAPKの活性化、抗アポトーシス、細胞増殖、AKTを調節
SPHK1	抗アポトーシス、細胞増殖、有糸分裂を調節、細胞移動
STAB1	炎症性応答、細胞接着、受容体媒介エンドサイトーシス、細胞-細胞シグナル伝達、血管形成の負の調節、細菌に対する防御応答
VEGFA	抗アポトーシス、TNFを調節、HIF1によって調節される

10

20

【0 4 4 6】

実施例 1 1 : $100\ \mu\text{M}$ Q 1 0 を用いる膵臓癌細胞 (PaCa2) の処理によって mRNA レベルで調節されるとして同定されるアポトーシス関連遺伝子

処理後の様々な時点において $100\ \mu\text{M}$ Q 1 0 で処理された試料についてアポトーシスアレイが実行された。実験は本質的に上記のように実施された。Q 1 0 処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表 2 5 に要約される。これらの結果は、以下の遺伝子が Q 1 0 処理によって調節されることを示した: ABL1、AKT1、Bcl2L1、BclAF1、CASP1、CASP2、CASP6、CIDEA、FADD、LTA、TNF、TNFSF10A、および TNFSF10。

30

【表 25】

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

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

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

10

20

【0447】

実施例 12 : 肝臓癌 (HepG2) 細胞上での PCR 糖尿病アレイ

HepG2 (肝臓癌) 細胞は、24 時間ビヒクルと、または様々な時間の間 $100 \mu M$ Q10 のいずれかで処理された。処理は、PaCa2 細胞において利用された手順に従って (上記、実施例 9-11)、ウェルあたり 1×10^5 細胞で開始された。しかし、これらの試料から抽出された RNA の総量は、予測されたものよりも低かった。逆転写は、通常、 $1 \mu g$ の総 RNA ($260 nm$ における測定によって決定される) を使用して行われる。逆転写あたりに使用できる最大量は $8 \mu l$ である。RNA 濃度が低いので、ビヒクル、ならびに 16 時間および 48 時間 Q10 処理された試料を使用する RT-PCR アレイ分析が、 $0.44 \mu g$ の RNA を使用して実施された。これらのアレイは、以下の表 26 において要約されるように、 $100 \mu M$ Q10 処理を用いる、HepG2 遺伝子調節における傾向およびパターンの初期の分析を提供した。結果は、遺伝子 PPARGC1A、PRKAA1、および SNAP25 の各々が処理の 16 時間後に下方調節されたことを示した (それぞれ、約 20 倍、6 倍、および 5 倍)。処理後 48 時間において、PPARGC1A および PRKAA1 は正常化され、またはわずかに上方調節されたのに対して、SNAP25 は約 2 倍下方調節された。

30

【表 26】

表 26 : HepG2 細胞が $100 \mu M$ Q10 で処理されたときの糖尿病アレイにおいて調節される遺伝子のリスト

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

40

【0448】

実施例 13 : 肝臓癌 (HEPG2) 細胞上の PCR 血管形成アレイ

HepG2 (肝臓癌) 細胞は、24 時間ビヒクルと、または様々な時間の間 $100 \mu M$

50

Q10のいずれかで処理された。処理は、PaCa2細胞において利用された手順に従って（上記、実施例9-11）、ウェルあたり 1×10^5 細胞で開始された。しかし、これらの試料から抽出されたRNAの総量は、予測されたものよりも低かった。逆転写は、通常、 $1 \mu\text{g}$ の総RNA（260nmにおける測定によって決定される）を使用して行われる。逆転写あたりに使用できる最大量は $8 \mu\text{l}$ である。RNA濃度が低いので、ビヒクル、ならびに16時間および48時間Q10処理された試料を使用するRT-PCRアレイ分析が、 $0.44 \mu\text{g}$ のRNAを使用して実施された。これらのアレイは、以下の表27において要約されるように、 $100 \mu\text{M}$ Q10処理を用いる、HepG2遺伝子調節における傾向およびパターンの初期の分析を提供した。Q10処理に際して調節されることが見い出された様々な遺伝子が以下の表27に要約される。結果は、遺伝子ANGPTL3、ANGPTL4、CXCL1、CXCL3、CXCL5、ENG、MMP2、およびTIMP3の各々が処理の16時間後に上方調節されたことを示した（それぞれ、対照のそれよりも、約5.5倍、3倍、3倍、3.2倍、3倍、3倍、1倍、および6.5倍、6倍および5倍）。ID3は、Q10処理の16時間後に、対照の約5倍下方調節された。処理の48時間後に、ANGPTL3、CXCL1、CXCL3、ENG、およびTIMP3はまだ上方調節されたのに対して（それぞれ、対照よりも約3.5倍、1.5倍、3.175倍、2倍、および3倍）、ANGPTL4、CXCL5、ID3、およびMMP2は、対照よりも、それぞれ、約1倍、1倍、2倍、および18倍下方調節された。

【表27】

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

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

【0449】

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

【0450】

ANGPTL3およびANGPTL4：ANGPTL3に関連する文献は、このタンパク質を脂質代謝の調節に関連付けている。特に、この文献（Li, C. Curr Opi

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

10

【0451】

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

20

【0452】

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

30

【0453】

実施例14：肝臓癌 (HEPG2) 細胞上のPCRアポトーシスアレイ

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

【0454】

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

40

【表 28】

表 28 : H e p G 2 細胞が $100\mu M$ Q 10 で処理されたときにアポトーシスアレイにおいて調節される遺伝子のリスト

遺伝子	遺伝子の名称	遺伝子の機能
BAG 1	BCL 2 関連アタノジーン	アポトーシスに関与
CASP 9	カスパーゼ 9、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	シトクロム c の放出を通じたアポトーシス
TNFRSF1A	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 1A	抗アポトーシス、多くの細胞死因子を結合、ICAM1 を調節

【0455】

実施例 15 : 腫瘍性障害を治療するための MIM または エピシフター の能力の評価

選択された MIM または エピシフター、例えば、CoQ10 が、腫瘍性障害、例えば、黒色腫を治療する能力は、マウスモデルにおいて評価される。黒色腫腫瘍は皮下層への SK-MEL 28 注射によってマウスの中で誘導される。動物研究は、各々が 4 匹のマウスを含む対照群と治療群の両方からなる。これらのマウスは 2 つの腫瘍を接種される。MIM または エピシフター の局所製剤は、30 日間の期間にわたって毎日処置群中の腫瘍に適用され、その後、腫瘍は切除され、重量が測定される。MIM または エピシフター は、処置群の全体の平均重量の差異が対照と比較して顕著であるときに、腫瘍を処置する際に有効であると同定される。

【0456】

実施例 16 : 腫瘍性障害と関連する MIM の同定

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

【0457】

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

【0458】

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

10

20

30

40

50

れる経路アレイを使用することによって評価される。2倍レベル以上で遺伝子のmRNA転写が変化される遺伝子が同定および評価される。細胞中でmRNAレベルの変化を誘導し、および／または正常細胞と比較して疾患細胞において1種以上のmRNAのレベルの示差的な変化を誘導する分子はMIMとして同定される。

【0459】

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

【0460】

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

【0461】

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

る細胞の変化と相関できる。

【0462】

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

10

【0463】

実施例17：腫瘍性障害に付随するエピシフターとしてのCoQ10の同定

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

【0464】

20

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

30

【0465】

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

40

【0466】

本明細書に記載された結果は、エピシフターとして内因性分子CoQ10を同定した。特に、結果は、細胞中で、代謝状態のシフト、および部分的にミトコンドリア機能の回復

50

を誘導するとしてC o Q 1 0を同定した。これらの結論は、本明細書に記載されているデータの以下の解釈、および関連分野における現在の知見に基づいている。

【0467】

Q 1 0は、合成され、ミトコンドリア内膜に能動輸送され、そこで富化され、およびそこで利用されることが知られている。Q 1 0はまた、エネルギー産生のためのミトコンドリアにおける酸化的リン酸化のプロセスのための必須のコファクターであることも知られている。しかし、多くの癌細胞は、多くの正常細胞のようにミトコンドリアにおいてピルビン酸の酸化によるのではなく、解糖とその後の細胞質ゾル中での乳酸発酵によって、優勢にエネルギーを産生する。酸化的リン酸化は、電子伝達系およびシトクロムcを含む。アポトーシスはミトコンドリアの破壊を含み、アポトーシス促進性因子によるミトコンドリア内膜の浸透能（permeabilization）を伴う。様々な代謝エネルギー合成経路を利用することによって、癌細胞は、細胞中の異常に対する通常のアポトーシス性応答を軽減することが可能である。理論によって束縛されることを望まないが、出願人は、酸化的リン酸化経路のタンパク質を上方調節すること、したがって、発癌の欠陥を認識し、アポトーシスの引き金を引く状態に戻るようにミトコンドリアの機能にスイッチを入れることによってQ 1 0が機能していることを提案する。したがって、Q 1 0は、細胞の代謝状態をシフトすることによってエピシフターとして作用している。

10

【0468】

実施例18：腫瘍性障害に付随するエピシフターの同定

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

20

30

【0469】

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

40

【0470】

タンパク質発現の変化は、抗体マイクロアレイ分析、質量分析特徴付けと連動した二次

50

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

10

20

【0471】

候補エピシフターは、候補エピシフターの添加に起因して、細胞系統中で、mRNAおよび/またはタンパク質レベルで遺伝子発現に誘導される変化に基づいて評価される。特に、候補エピシフターは、細胞代謝プロセスに付随するかまたはそれに関与することが知られている遺伝子を調節するそれらの能力に基づいて評価される。腫瘍性障害に特に関連するものとして、候補エピシフターは、例えば、アポトーシス、癌生物学、および細胞増殖に付随することが知られている遺伝子を調節するそれらの能力に基づいて評価される。

【0472】

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

30

【0473】

前述の実験から得られた結果に基づいて細胞の代謝状態のシフトを誘導することが観察された候補エピシフターは、エピシフターとして同定される。例えば、細胞傷害性を表示し、および/または細胞中でアポトーシスを誘導する候補エピシフターは、エピシフターとして同定される。好ましくは、正常細胞と比較して、疾患(癌)細胞において示差的な細胞傷害性を表示し、および/またはアポトーシス性応答を示差的に誘導する候補エピシフター(例えば、正常細胞と比較して、癌細胞においてアポトーシスに関与しているタンパク質の発現を示差的に調節するエピシフター)は、エピシフターとして同定される。

40

【0474】

実施例19: エピシフターとしてのビタミンD3の同定

ビタミンD3、すなわち、1 α 、25-ジヒドロキシビタミンD3(カルシトリオールとしてもまた知られる)は、ビタミンDから2段階酵素プロセスによって合成されるビタミンD代謝物である。ビタミンD3はその遍在性核ビタミンD受容体(VDR)と相互作用し、カルシウムおよびリン酸の恒常性ならびに細胞分裂および分化に関与する遺伝子の

50

広範なスペクトルの転写を調節する。ビタミンD3は、扁平上皮細胞癌、前立腺腺癌、卵巣癌、乳癌、および肺癌を含む多数のモデル系において抗癌効果を有することが報告されている（Deeb et al., 2007 Nature Reviews Cancer 7:684~700に概説されている）。

【0475】

ビタミンD3の抗癌効果は、細胞周期のG1期での増殖停止、アポトーシス、腫瘍細胞分化、増殖因子媒介性細胞生存シグナルの破壊、ならびに血管形成および細胞接着の阻害を含む、複数のメカニズムを含むことが報告されている（Deeb et al., 2007 Nature Reviews Cancer 7:684~700に概説されている）。例えば、特にアポトーシスに関して、ビタミンD3は、アポトーシスの鍵となる媒介因子を調節すること、例えば、抗アポトーシス性の生存促進性タンパク質BCL2およびBCL-XLの発現を抑制すること、またはアポトーシス促進性タンパク質（例えば、BAX、BAK、およびBAD）の発現を誘導することによってアポトーシスを誘導することが報告されてきた（Deeb et al., 2007）。さらなる例において、特に血管形成に関連して、ビタミンD3は、いくつかの腫瘍由来内皮細胞の増殖を阻害すること、および腫瘍において血管形成を誘導する血管内皮増殖因子（VEGF）の発現を阻害することが報告されてきた（Masuda and Jones, 2006 Mol. Cancer Ther. 5(4):797~8070に概説されている）。別の例において、特に細胞周期停止に関して、ビタミンD3は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21WAF1/CIP1の遺伝子転写を誘導すること、ならびにサイクリン依存性キナーゼインヒビターp27KIP1タンパク質の合成および／または安定化を誘導することが報告されており、これらの両方とも、G1停止の誘導のために決定的である（Deeb et al., 2007）。

【0476】

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

【0477】

実施例20：鍵となるタンパク質の要約

要約として、前述の実施例に記載された実験の結果に基づいて、Q10によって調節される鍵となるタンパク質は以下の表に要約される。

【表 29】

表 29. Q10 によって調節される鍵となるタンパク質

経路	例
転写因子	HNF4α
アポトーシス性応答	Bcl-x1、Bcl-xS、BNIP-2、Bcl-2、Birce6、Bcl-2-L11 (Bim)、XIAP、BRAF、Bax、c-Jun、Bmf、PUMA、cMy
ペントースリン酸経路	トランスアルドラーゼ1
生合成経路	COQ1、COQ3、COQ6、プレニルトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシベンゾエート
酸化ストレス（酸化促進剤）	好中球細胞質因子2、一酸化窒素シンターゼ2A、スーパーオキシドディスムターゼ2（ミトコンドリア）
膜の変化	VDAC、Bax channel、ANT、
酸化的リン酸化代謝	シトクロムc、複合体I、複合体II、複合体III、複合体IV、

10

【0478】

実施例 21：コエンザイム Q10 に対する発癌性細胞および正常細胞の相対的感受性

種々の発癌性および正常細胞系統に対するコエンザイム Q10 処置の効果が試験および比較された。コエンザイム Q10 に対する細胞の感度は、アポトーシスの誘導を監視することによって評価された。細胞の C o Q10 処置は、材料および方法において以下に詳細に記載されるように実行された。アポトーシスの誘導は、以下に記載されるように、早期アポトーシスの指標（例えば、Bcl-2 発現、カスパーゼ活性化、およびアネキシン V アッセイを使用することによって）を監視することによって処置された細胞中で評価された。これらの研究から、細胞系統のパネルにおいてアポトーシスを誘導するために必要である最小限の C o Q 投薬量、例えば、C o Q10 の濃度および処置の時間が決定された。

20

【0479】

予測されずかつ驚くべき結果において、データは、コエンザイム Q10 処置の効力が、発癌性の増加および／またはより大きな転移の潜在能力を示した細胞型、すなわち、より侵襲性癌または腫瘍から誘導された細胞型においてより大きかったことを実証した。これらの研究の結果は、表 30 において以下に要約されている。このデータは、C o Q が、より高い侵襲性の癌の状態にある細胞に対して、時間と濃度の両方に依存的な様式でより有効であることを実証する。さらに、驚くべき相違する効果が、発癌性細胞と比較した場合に、正常細胞に対して観察された。具体的には、コエンザイム Q10 は、正常組織環境においてわずかに支持的な役割を示すことが予想に反して見い出され、ここで、増殖および移動の増加が、ケラチン形成細胞および皮膚線維芽細胞を含む正常細胞において観察された。

30

【0480】

癌における遺伝子調節およびタンパク質メカニズムに対するコエンザイム Q10 の効果は、正常細胞においては異なっている。膜の流動性、輸送メカニズム、免疫調節、血管形成、細胞周期制御、ゲノム安定性、酸化制御、解糖流量、代謝制御、および細胞外マトリックスタンパク質の完全性などの、鍵となる細胞の機構および構成要素は、異常調節され、したがって、細胞の遺伝的および分子的な指紋が変化している。疾患環境は、細胞制御プロセスの支配が優勢である。本明細書に提供されるデータは、アポトーシス能力の回復を可能にする様式で鍵となる上述のプロセスのいくつかを正常化することによって、C o Q10 が、より高いレベルの効力を発揮していることを示唆する（例えば、正常細胞に対する癌細胞において、およびより侵襲性の低いまたは非侵襲性の癌状態の細胞と比較した場合のより侵襲性の高い癌状態の細胞において）。

40

【表 30】

表 30 : 様々なタイプの細胞において早期のアポトーシスの誘導に必要な最小 $C o Q 1$ の濃度と処理時間

由来する組織 (細胞の種類)	早期アポトーシスの兆候 (Bcl-2、アネキシンV、またはカスパーゼ活性化)	濃度 (μ M)	時間 (時)	攻撃性のレベル 1 = 正常組織 2 = 悪性 3 = 転移性
皮膚				
ケラチノサイト (Hek a, Hek n)	なし	N/A	N/A	1
線維芽細胞 (nFib)	なし	N/A	N/A	1
メラニン形成細胞 (Hema, LP)	なし	N/A	N/A	1
メラノーマ (Skme128)	強い	20	24	2
メラノーマ (Skme12)	非常に強い	25	24	3
SCC、扁平上皮細胞癌腫	非常に強い	25	24	3
乳房				
MCF-7	強い	50	48	2
SkBr-3	非常に強い	50	24	3
BT-20	強い	100	48	2
ZR-75	わずか	200	72	2
MDA MB 468	強い	100	48	2
乳腺線維芽細胞 184A1および184B5 (Lawrence Berkeley)	なし	N/A		1
前立腺				
PC3	非常に強い	25	24	3
肝臓				
HepG2	非常に強い	50	24	3
Hep3B	非常に強い	50	24	3
骨				
骨肉腫 (143b)	非常に強い	50	48	2
ユーイング肉腫 (NCI)	極めて強い	5	1	3
膵臓				
PaCa2	非常に強い	25	24	3
心臓				
大動脈平滑筋 (HASC)	なし	N/A	N/A	1

【0481】

材料および方法

細胞の調製および処置

ディッシュまたはフラスコで調製された細胞

細胞は、37℃インキュベーター中、5%CO₂レベルで、10%ウシ胎仔血清 (FBS)、1%PSA (ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB) (InvitrogenおよびCellgro) を補充した関連培地を有するT-75フラスコ中で、70-80%コンフルエンスに達するまで培養された。処置のために細胞を収穫するために、フラスコに1mLトリプシンが加えられ、吸引され、さらに3mLでトリプシン処置

され、そして37℃で3-5分間インキュベートされた。次いで、細胞は、等量の培地で中和され、その結果生じた溶液は10,000rpmで8分間遠心分離された。上清は吸引され、細胞は8.5mlの培地で再懸濁された。500μlの再懸濁物と9.5mlのイソプロパノールの混合物が、コールターカウンターによって2回読み取られ、各ディッシュに播種される適切な細胞の数が決定された。対照および0-200μMの濃度範囲の群が3連で試験された。500μM CoQ-10ストック溶液から段階希釈が実施されて、適切なディッシュ中での所望の実験濃度を達成した。ディッシュは、細胞型および実験プロトコルに依存して、5%CO₂レベルで0-72時間の間、37℃インキュベーター中でインキュベートされた。

【0482】

タンパク質の単離および定量

ディッシュ中で調製される細胞

細胞処置インキュベーション時間が完了後、タンパク質の単離が実施された。すべての処置群のディッシュは、2mlの氷冷1×リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で2回、1mlで1回洗浄された。PBSは最初の2回の洗浄後のみ、ディッシュから吸引された。細胞は穏やかにかき取られ、3回目の洗浄からの最終量を使用して微量遠心分離チューブに収集され、10,000rpmで10分間遠心分離された。遠心分離後、上清は吸引され、ペレットは50μLの溶解緩衝液(100μLの溶解緩衝液毎に1μLのプロテアーゼおよびホスファターゼ(phosphatase)インヒビター)で溶解された。次いで、試料は-20℃で一晩凍結された。

【0483】

フラスコ中で調製される細胞

細胞処置インキュベーション時間が完了後、タンパク質の単離が実施された。すべての処置群のフラスコは、5mlの氷冷1×PBSで2回、3mlで1回洗浄された。PBSは最初の2回の洗浄後のみ、フラスコから吸引された。細胞は穏やかにかき取られ、3回目の洗浄からの最終量を使用して15mL遠心分離チューブに収集され、10,000rpmで10分間遠心分離された。遠心分離後、上清は吸引され、ペレットは適切な量の溶解緩衝液(100μLの溶解緩衝液毎に1μLのプロテアーゼおよびホスファターゼ(phosphatase)インヒビター)で溶解された。溶解緩衝液の量はペレットサイズに依存した。試料は微量遠心チューブに移され、-20℃で一晩凍結された。

【0484】

タンパク質の定量

試料は-4℃で融解し、超音波処理して、タンパク質単離の翌日における均質化を確実にした。タンパク質の定量は、マイクロBCAタンパク質アッセイキット(Pierce)を使用して実施された。イムノブロットングのための試料を調製するために、βメルカプトエタノール(Sigma)対試料緩衝液(Bio-Rad)1:19溶液が調製された。試料は、βメルカプトエタノール-試料緩衝液を用いて1:1に希釈され、95℃で5分間煮沸し、そして-20℃で一晩凍結させた。

【0485】

イムノブロットング

Bcl-2、カスパーゼ、9、シトクロムc

ウェルあたりロードするための試料の量は、BCAタンパク質アッセイから得られたそのままの平均タンパク質濃度を使用して決定された。約30-60μgのタンパク質が各処置の時点のためにロードされた。タンパク質は、12% Tris-HClレディーゲル(Bio-Rad)またはハンドキャストゲル上で、1×泳動緩衝液中で、85および100ボルトにて3連で泳動された。次いで、タンパク質は、100ボルトで1時間、ニトロセルロースペーパーに転写され、5%ミルク溶液中でさらに1時間ブロッキングされた。膜は、一晩、-4℃で一次抗体(1μL Ab:1000μL TBST)(Cell Signaling)中に配置された。翌日、膜は、10分間を3回、各々Tris緩衝化生理食塩水Tween-20(TBST)で洗浄され、および二次抗体(抗ウサギ

10

20

30

40

50

；1 μ L Ab：1000 μ L TBS T) が -4°C で1時間適用された。膜は、再度、10分間を3回、TBS Tで洗浄され、ピコまたはフェムト基質を使用する化学発光が完了した(Pierce)。次いで、膜は、最良の視覚的結果を生じる時間間隔で発色された。発色後、膜は、アクチンレベルが測定可能になるまで、TBS T中で -4°C に維持された。

【0486】

アクチン

膜は、 -4°C で1時間、一次アクチン抗体(1 μ L Ab：5000 μ L TBS T)(Cell Signaling)中に配置され、10分間を3回、各々TBS Tで洗浄され、二次抗体(抗マウス；1 μ L Ab：1000 μ L TBS T)が -4°C で1時間適用された。膜は、再度、10分間を3回、各々TBS Tで洗浄され、ピコ基質を使用する化学発光が完了した(Pierce)。次いで、膜は、最良の視覚的結果を生じる時間間隔で発色された。

10

【0487】

アネキシンVアッセイ

細胞は、PBS 10X中で2回洗浄し、結合緩衝液(0.1M HEPES、pH 7.4；1.4M NaCl；25mM CaCl₂)に再懸濁された。100 μ lの試料が、5 μ lのアネキシン-P E染料または7-ADDとともに、培養チューブに加えられた。細胞は混合され、遮光して、室温にて15分間インキュベートされた。その後、400 μ lの1 $\times$ 結合緩衝液が各試料に加えられ、これらはフローサイトメトリーによる分析に供された。

20

【0488】

実施例21：コエンザイムQ10を用いて処置された細胞のウェスタン分析

過去50年にわたって、悪性形質転換の根底にある原因としての特定のプロセスに影響を与える内因性／外因性因子に関わりがある膨大な量の情報が生じてきた。臨床的および基礎的文獻は、DNA構造および機能の変化が、癌を遺伝病として規定する、癌の開始および進行において顕著な役割を果たすという証拠を提供している(Wooster, 2010；Haiman, 2010)。1920年代初頭、発癌の病因論の根本的な変化を特徴付けることに従事していたOtto Warburgおよび他の研究者は、2つの主要な観察(a) Warburg効果としてもまた知られる、酸素の存在下でのエネルギー産生のためのATPの生成においてグルコースを輸送および利用する細胞の能力、ならびに(b) ミトコンドリアATPの産生の減少に導く電子伝達の変化を含む、ミトコンドリアの構造および機能の変動を記述した。過去数年間は、癌の病因論、すなわち、癌を転移性疾患として見ることににおける細胞バイオエネルギーの中心的な役割を調べることの復活であった。

30

【0489】

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

40

【0490】

正常細胞において、ミトコンドリアの酸化的リン酸化は、十分なATPを生成して、正常な生理学的活性および細胞生存を維持するためのエネルギー要求に合致している。ミトコンドリアのエネルギー産生の結果は、反応性酸素種(ROS)の生成であり、その異常な産生はミトコンドリアの損傷に導く(参照)。発癌の病因論に関わりがある現象である

50

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

10

【0491】

エピーメタボロームシフトを引き起こすMIMとしてのコエンザイムQ10

本明細書に提示されるデータは、コエンザイムQ10を用いた正常および癌細胞の処置が、解糖－ミトコンドリア酸化ストレス連続体の中で鍵となる生化学的末端を調節するタンパク質の発現の変化に関与することを実証する。ウェスタンブロットングおよび酸素消費によるタンパク質発現の評価を説明するデータの組み合わせは、正常細胞において、コエンザイムQ10の曝露後に、正常な解糖およびミトコンドリア速度の有意な変化がないことを実証する。したがって、正常細胞系統、例えば、HDFa（正常ヒト成体線維芽細胞）、HASMC（正常ヒト大動脈平滑筋細胞）、nFib（正常線維芽細胞）、およびHeKa（正常ヒトケラチン生成細胞）におけるタンパク質の発現の値およびミトコンドリア呼吸速度は、ベースライン生理学的状態を表すと見なすことができる。癌細胞系統、例えば、HepG2（肝臓癌）、Paca-2（膵臓癌）、MCF7（乳癌）、SK-MEL（黒色腫）、およびSCC-25（扁平上皮細胞癌）におけるタンパク質の発現およびミトコンドリア呼吸速度の何らかの逸脱は、この場合は、癌における疾患の開始／進行に起因する変化を表す。実験的証拠は、癌細胞に対するコエンザイムQ10の曝露が、正常細胞を彷彿とさせる細胞の病態生理学的再組織化と関わりがあるという仮説に対するサポートを提供する。具体的には、本明細書に提供されるデータは、癌細胞中でのコエンザイムQ10曝露は、正常細胞において観察される細胞構造に対する、細胞構造の全体的な再組織化の誘導の原因である、解糖経路におけるシフトおよびミトコンドリアの酸化的リン酸化と関わりがあることを実証する。

20

30

【0492】

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

40

【0493】

実験手順

ウェスタンブロット実験1

実験のために使用された細胞はHDFa細胞およびMCF-7細胞であり、これらは、

50

2つの異なる濃度、50 μ Mおよび100 μ MでコエンザイムQ10で処置されるかまたは処置されず、そして処置の24時間後に収穫された。全細胞ペレットが1 mLのC7緩衝液中で一度に再懸濁され、ラベルされた15 mLチューブに移された。次いで、試料は、低温室にて、氷上で、番号14の設定で6回の超音波パルスを使用して超音波処理された。超音波処理後、試料は2500 gで短時間遠心分離し、試料は2 mLチューブに移された。50 mL試料チューブに残っている泡を使用して、各試料のpHが確認された（pHは9.0であるはずである）。

【0494】

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

【0495】

試料は上記のような標準のプロトコルに従って処置され、各試料中のタンパク質の量はBradfordアッセイによって決定された。10 μ gタンパク質に等価な試料体積が、以下に示されるように、Lamelliローディング染料（LDS）およびMilliQ水を用いて調製され、4～12% Bis-Tris Novex NuPAGEゲル（Invitrogen, カタログ番号NP0323Box）上で泳動された。

【0496】

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

【0497】

HDFaおよびMCF-7試料におけるIDH1およびATPクエン酸リアーゼレベル
転写後、各プロットは、2枚のWhatman濾紙の間に配置され、15～20分間乾燥された。乾燥後、プロットは、日付、試料の型、およびプロット1かプロット2のいずれかをHB鉛筆でラベルされた。分子量マーカーは、鉛筆で輪郭が描かれ、1本線は青色であり、2本線は着色マーカーであった。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で1時間室温でブロッキングされ、次いで、TBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄された。プロット1は5% BSAを有するTBS-T中のIDH1に対する一次抗体（Cell Signaling番号3997）（1：1000希釈）でプローブされ、プロット2は、振盪しながら4℃で一晩のインキュベーションによって、1：1000希釈の5% BSA中のATPクエン酸リアーゼについてのウサギポリクローナル抗体（Cell Signaling番号4332）を用いた。一次抗体との一晩のインキュベーション後、プロットは、TBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体（抗ウサギ；1：10,000希釈）でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、プロットはTBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、次いで、5分間、

E C F 試薬とともにインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μ M 解像度、16 ビット、緑色レーザー、400 V、および500 V でスキャンされた。

【0498】

H D F a および M C F - 7 試料におけるアクチンレベル

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

【0499】

ウェスタンプロット実験2

この実験において使用された細胞は、SKMEL28、SCC-25、nFib、およびHekaであり、これらは、2つの異なる濃度、50 μ Mおよび100 μ MでコエンザイムQ10で処置されるかまたは処置されず、そして処置の3、6、および/または24時間後に収穫された。試料は、上記のように、処理され、4-12% Bis-Tris Novex NuPAGEゲル上で泳動された。ゲルは、本質的に上記のように、泳動され、転写され、そして染色された。

【0500】

4つの細胞系統についてのIDH1のレベル

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

【0501】

4つの異なる細胞系統におけるATPクエン酸リアーゼレベル

イソクエン酸デヒドロゲナーゼプロットが、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBS-Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBS-Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは完全な剥がしについてチェックす

るためにレーザースキャナーでスキャンされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄された。次いで、これは、1:1000希釈の5% BSA中のATPクエン酸リアーゼについてのウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling 番号4332) で、振盪しながら、4℃で一晩プローブされた。ATPクエン酸リアーゼに対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はTBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体 (抗ウサギ; 1:10,000希釈) でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、プロットはTBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

【0502】

異なる4つの細胞系統におけるアクチンレベル

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

【0503】

ウェスタンブロット実験3

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

【0504】

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

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

【0505】

ウェスタンブロット実験4

この実験において使用された細胞はHep G 2であり、これらは、2つの異なる濃度、50 μ Mおよび100 μ MでコエンザイムQ10で処置されるかまたは処置されず、そして処置の24または48時間後に収穫された。試料は、上記のように、処理され、4-12% B i s - T r i s N o v e x N u P A G Eゲル上で泳動された。ゲルは、本質的に上記のように、泳動され、転写され、そして染色された。

【0506】

Hep G 2細胞における乳酸デヒドロゲナーゼレベル

転写後、各プロットは15~20分間乾燥され、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。次いで、このプロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で、室温で1時間ブロッキングされ、次いで、TBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、5% BSA中の乳酸デヒドロゲナーゼに対する一次抗体 (a b c a m a b 2 1 0 1; ポリクローナル) (1:1000希釈) を用いて、振盪しながら、4℃で一晩のインキュベーションによってプローブされた。乳酸デヒドロゲナーゼに対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、プロットは、TBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、二次抗体 (ウサギ抗ヤギ; 1:10,000希釈) を用いて、室温で1時間プローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、プロットはTBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とともにインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 F u j i L a s e r スキャナーで、25 μ M解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

【0507】

Hep G 2細胞における筋肉型ピルビン酸キナーゼ (PKM2) レベル

乳酸デヒドロゲナーゼプロットが、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBS-Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBS-Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。2つのプロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、そして、1:500希釈の5% BSA中のピルビン酸キナーゼM2に対するウサギポリクローナル抗体 (NOVUS BIOLOGICALS カタログ番号H00005315-D01P) で、振盪しながら、室温で1時間プローブされた。ピルビン酸キナーゼM2に対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はTBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体 (抗ウサギ; 1:10,000希釈) でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、各プロットはTBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 F u j i L a s e r スキャナーで、25 μ M解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

【0508】

Hep G 2細胞におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼ β レベル

ピルビン酸キナーゼプロットが、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBS-Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBS-Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。2つのプロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。抗体が剥がされたことおよびECF試薬が働いたことを確認した後、プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBS-T (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、そして、1:5000希釈の5% BSA中のピルビン酸デヒドロゲナーゼに対

する抗体（A B N O V A カタログ番号H 0 0 0 0 5 1 6 2 - M 0 3）で、振盪しながら、4℃で一晩プローブされた。ピルビン酸デヒドロゲナーゼに対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はT B S - T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体（抗マウス；1：10，000希釈）でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、各プロットはT B S - T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、次いで、5分間、E C F 試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 F u j i L a s e r スキャナーで、25μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

【0509】

H e p G 2 細胞におけるアクチンレベル

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

【0510】

ウェスタンブロット実験5

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

【0511】

P a C a 2 細胞中の乳酸デヒドロゲナーゼ（L D H）およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ（P D H）レベル

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

【0512】

P a C a 2 細胞におけるカスパーゼ3レベル

プロットは、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のT B S - Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のT B S - Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。2つのプロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてT B S Tで15分間洗浄された。プロットは、T B S - T中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、T B S - T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、そして、5% B S A中のカスパーゼ3に対する抗体（S a n t a c r u z B i o t e c h n o l o g y 番号s c 7 2 7 2、1：200希釈）で、振盪しながら、4℃で一晩プローブされた。カスパーゼ3に対する一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はT B S - T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体（抗マウス；1：10，000希釈）でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、各プロットはT B S - T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、次いで、5分間、E C F 試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 F u j i L a s e r スキャナーで、25μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

【0513】

ウェスタンブロット実験6

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

10

20

30

40

50

【0514】

異なる細胞型におけるカスパーゼ（Caspase）3およびアクチンレベル

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

【0515】

ウェスタンブロット実験7

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

10

【0516】

アクチンのための実験プロトコル

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

【0517】

Hif 1 α 、カスパーゼ3、およびPDHBのための実験プロトコル

アクチンプロットが、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBSTを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBSTを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBSTで15分間洗浄された。プロットは、TBST中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBST（1 $\times$ -15'；2 $\times$ 各5'）で3回洗浄され、そして、1：200希釈の5% BSA中のHif 1 α 、カスパーゼ3、またはPDHBに対する抗体で、穏やかに振盪しながら、4℃で一晩プローブされた。Hif 1 α に対する一次抗体（Abcam ab2185；抗ウサギ）は、5% BSA中で1：500希釈であった。カスパーゼ3に対する一次抗体（Santa Cruz sc7272；抗ウサギ）は、5% BSA中で1：200希釈であった。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ β （PDHB）に対する一次抗体（Novus Biologicals H00005162-M03；抗マウス）は、5% BSA中で1：500希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はTBST（1 $\times$ -15'；2 $\times$ 各5'）で3回洗浄され、室温にて1時間、二次抗体（PDHB抗マウス；Hif 1 α 、およびカスパーゼ3抗ウサギ；1：10，000希釈）でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、各プロットはTBST（1 $\times$ -15'；2 $\times$ 各5'）で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μ M解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

20

30

【0518】

PKM2、SDHB、およびSDHCのための実験プロトコル

上記のプロットは、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBSTを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBSTを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBSTで15分間洗浄された。プロットは、TBST中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBST（1 $\times$ -15'；2 $\times$ 各5'）で3回洗浄され、そして、TBST中の5% BSA中のPKM2、SDHB、またはSDHCに対する一次抗体で、穏やかに振盪しながら、インキュベーションにより、4℃で一晩プ

40

50

ローブされた。SDHCに対する一次抗体（ABNOVA H00006391-M02；抗マウス）は1：500希釈であった。SDHBに対する一次抗体は、Abcam ab4714-200から；抗マウス；1：1000希釈であった。ピルビン酸キナーゼM2（PKM2）に対する一次抗体は、Novus Biologicals H00005315-D01Pから；抗ウサギ；1：500希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はTBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体（SDHB&C 抗マウス；およびPKM2 抗ウサギ；1：10,000希釈）でプローブされた。1時間のインキュベーション後、プロットはTBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

10

【0519】

L DHおよびB i kのための実験プロトコル

上記のプロットは、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBS-Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBS-Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは完全な剥がしについてチェックするためにレーザースキャナーでスキャンされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、そして、5% BSA中のLDHまたはB i kに対する一次抗体で、穏やかに振盪しながら、インキュベーションにより、4℃で一晩プローブされた。LDHに対する一次抗体はAbcam ab2101から；抗ヤギ；1：1000希釈であった。B i kに対する一次抗体は、Cell Signaling 番号9942から；抗ウサギ；1：1000希釈であった。一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はTBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体（LDH抗ヤギ；Jackson LaboratoriesおよびB i k抗ウサギ；1：10,000希釈）でプローブされた。1時間のインキュベーション後、プロットはTBS-T（1×-15'；2×各5'）で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

20

30

【0520】

ウェスタンブロット実験9

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

【0521】

アクチンのための実験プロトコル

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

40

【0522】

カスパーゼ3およびMMP-6のための実験プロトコル

アクチンプロットが、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBS-Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBS-Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で室

50

温で1時間ブロックされ、次いで、TBS-T (1×-15' ; 2×各5') で3回洗浄され、そして、5% BSA中のカスパーゼ3またはMMP-6に対する抗体で、穏やかに振盪しながら、インキュベーションにより、4℃で一晩プローブされた。カスパーゼ3に対する一次抗体 (Abcam ab44976-100 ; 抗ウサギ) は5% BSA中1 : 500希釈であった。MMP-6に対する一次抗体 (Santa Cruz scMM0029-ZB5 ; 抗マウス) は5% BSA中1 : 100希釈であった。一次抗体との一晩のインキュベーション後、膜はTBS-T (1×-15' ; 2×各5') で3回洗浄され、室温にて1時間、二次抗体 (MMP-6 抗マウス ; カスパーゼ3 抗ウサギ ; 1 : 10, 000希釈) でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、各プロットはTBS-T (1×-15' ; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laserスキャナーで、25 μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

10

【0523】

LDHのための実験プロトコル

上記のプロットは、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBS-Tを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBS-Tを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBS-Tで15分間洗浄された。プロットは、TBS-T中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBS-T (1×-15' ; 2×各5') で3回洗浄され、そして、穏やかに振盪を伴う、5% BSA中または5% ミルク中のLDHに対する一次抗体とのインキュベーションによって、4℃で一晩プローブされた。LDH 080309b1に対する一次抗体 (Abcam ab2101 ; 抗ヤギ) は5% BSA中1 : 1000希釈であった。LDH 080309b2に対する一次抗体 (Abcam ab2101 ; 抗ヤギ) は5% ミルク中1 : 1000希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はTBS-T (1×-15' ; 2×各5') で3回洗浄され、二次抗体 (Jackson Immuno Research 抗ヤギ ; 1 : 10, 000希釈 ; 305-055-045) で1時間プローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、プロットはTBS-T (1×-15' ; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laserスキャナーで、25 μM解像度、16ビット、緑色レーザー、400V、および500Vでスキャンされた。

20

30

【0524】

トランスアルドラーゼおよびHif1aのための実験プロトコル

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

40

50

各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μ M 解像度、16 ビット、緑色レーザー、400 V、および500 Vでスキャンされた。

【0525】

IGFBP3 および TP53 のための実験プロトコル

上記のプロットは、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBSTを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBSTを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBSTで15分間洗浄された。プロットは、TBST中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBST (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、そして、穏やかに振盪しながら、4℃で一晩のインキュベーションによって、5% BSA中のIGFBP3またはTP53に対する一次抗体で一晩プローブされた。IGFBP3に対する一次抗体 (Abcam ab76001; 抗ウサギ) は1:100希釈であった。TP53に対する一次抗体 (Sigma Aldrich AV02055; 抗ウサギ) は1:100希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はTBST (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体 (抗ウサギ; 1:10,000希釈) でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、プロットはTBST (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μ M 解像度、16 ビット、緑色レーザー、400 V、および500 Vでスキャンされた。

【0526】

トランスアルドラーゼおよびPDHBのための実験プロトコル

上記のプロットは、メタノールと30分間インキュベートされ、続いて2回のTBSTを用いる10分間の洗浄、次いで50℃のストリッピング緩衝液との30分間のインキュベーション、続いて、100ml以上のTBSTを用いる各30分間の2回の洗浄によって剥がされた。プロットは、メタノールで5秒間活性化され、水で5分間、そしてTBSTで15分間洗浄された。プロットは、TBST中の5%ブロッキング試薬で室温で1時間ブロックされ、次いで、TBST (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、そして、穏やかに振盪しながら、4℃で一晩のインキュベーションによって、5% BSA中のトランスアルドラーゼまたはPDHBに対する一次抗体で一晩プローブされた。トランスアルドラーゼに対する一次抗体 (Santacruz sc51440; 抗ヤギ) は1:200希釈であった。PDHBに対する一次抗体 (Novus Biologicals H00005162-M03; 抗マウス) は1:500希釈であった。一次抗体とのインキュベーション後、膜はTBST (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、旋回角度可変シェーカー上で、室温にて1時間、二次抗体 (抗ヤギまたは抗マウス; 1:10,000希釈) でプローブされた。二次抗体との1時間のインキュベーション後、プロットはTBST (1×-15'; 2×各5') で3回洗浄され、次いで、5分間、ECF試薬とインキュベートされ、次いで、各プロットは、5100 Fuji Laser スキャナーで、25 μ M 解像度、16 ビット、緑色レーザー、400 V、および500 Vでスキャンされた。

【0527】

結果

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1- (IDH-1)

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1- (IDH-1) は、ミトコンドリア基質の中に通常存在するTCA回路の一部である酵素の1つである。しかし、IDH1は、イソクエン酸から α -ケトグルタル酸への酸化的脱カルボキシル化を触媒し、2段階工程で二酸化炭素を生成する細胞質ゾル型の酵素である。IDH1は、細胞質ゾルおよびペルオキシソームに存在するNADP⁺依存性型である。IDH1はSer113リン酸化によって不活性化され、クエン酸回路がないものを含む多くの種において発現される。IDH1は、部

分的にH I F - 1の活性化を通して、不活性化が腫瘍形成に寄与する腫瘍抑制因子として通常は機能しているようである（B a y l e y 2010；R e i t m a n, 2010）。最近の研究は、膠芽細胞腫の病因学におけるI D H 1の不活性化変異に関わっている（B l e e k e r, 2009；B l e e k e r, 2010）。

【0528】

コエンザイムQ10での処置は、M C F - 7、S K M E L 28、H e p G 2、およびP a C a - 2細胞を含む癌細胞株におけるI D H 1の発現を増加した。S C C 25細胞系統においては中程度の発現の増加が存在した。ヒト由来初代線維芽細胞H D F aとは対照的に、n F I Bおよびヒト大動脈平滑筋細胞H A S M Cは、コエンザイムQ10に応答して、I D H 1の発現パターンの有意な変化を実証しなかった。 α -ケトグルタル酸（ α -K G）は、T C A回路における鍵となる中間体であり、イソクエン酸から生化学的に合成され、最終的にはスクシニルC o Aに転換され、薬物となり得るM I Mおよびエピシフターである。 α -K GはT C A回路の中間体を補充するために細胞によって使用でき、酸化的リン酸化を増加するための還元当量の生成を生じるので、 α -K Gの生成はT C A回路における決定的な岐路として働く。したがって、コエンザイムQ10媒介性のI D H 1発現の増加は、癌細胞における酸化的リン酸化を増強するためにミトコンドリアのT C A回路によって使用できる中間体の形成を生じる。結果を、以下の表31～33にまとめる。

【表31】

表31：H D F aおよびM C F - 7中のI D H 1

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

【表32】

表32：処理後のH e p G 2中のI D H 1に対するH A S M C中のI D H 1

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

【表 3 3】

表 3 3 : 処理後の P A C A 2 中の I D H 1 に対する H A S M C 中の I D H 1

量-組成	標準化強度
HAS 5 g 4 8-培地	5 6 2
HAS 5 g 4 8-5 0-コエンザイムQ10	5 0 9
HAS 5 g 4 8-1 0 0-コエンザイムQ10	6 2 7
HAS 2 2 G 4 8-培地	8 2 2
HAS 2 2 G 4 8-5 0-コエンザイムQ10	1 0 2 8
HAS 2 2 G 4 8-1 0 0-コエンザイムQ10	1 0 1 5
PACA 5 g 4 8-培地	1 0 9 5
PACA 5 g 4 8-5 0-コエンザイムQ10	1 0 9 5
PACA 5 g 4 8-1 0 0-コエンザイムQ10	8 6 0
PACA 2 2 G 4 8-培地	1 1 0 3
PACA 2 2 G 4 8-5 0-コエンザイムQ10	1 5 0 3
PACA 2 2 G 4 8-1 0 0-コエンザイムQ10	1 6 3 0

10

【0 5 2 9】

A T P クエン酸リアーゼ (A C L)

A T P クエン酸リアーゼ (A C L) は、細胞質ゾル中でアセチル-C o A およびオキサロ酢酸の形成を触媒するホモテトラマー (~1 2 6 k d) 酵素である。この反応は、糖生成と同様に、脂肪酸、コレステロール、およびアセチルコリンの生合成のための最初の非常に重要なステップである (T o w l e e t a l . , 1 9 9 7) 。栄養およびホルモンがこの鍵となる酵素の発現レベルおよびリン酸化状態を調節している。A k t および P K A による A C L の S e r 4 5 4 リン酸化が報告されている (B e r w i c k . , D C M W e t a l . , 2 0 0 2 ; P i e r c e M W e t a l . , 1 9 8 2) 。

20

【0 5 3 0】

データは、正常細胞および癌細胞における A T P クエン酸リアーゼに対するコエンザイム Q 1 0 の効果を説明している。癌細胞において、A C L 酵素の発現の用量依存的な減少が存在することが一貫して観察されている。対照的に、正常細胞においては、A C L の発現の増加に向かう傾向が存在するようである。細胞質ゾル A C L は、増殖因子刺激の間および分化の間に、細胞におけるヒストンアセチル化のために必須であることが実証されてきた。新生物プロセスにおいて重要なプロセスであるヒストンアセチル化のために必須であるアセチル C o A を生成するために、A C L が細胞質ゾルのグルコース由来のクエン酸を利用するという事実は、癌細胞機能に影響を与える際のコエンザイム Q 1 0 誘導 A C L 発現の役割を実証する。細胞質ゾル A C L によってクエン酸から生成されたアセチル-C o A は、細胞分裂の間の新たな脂質およびコレステロールの生合成のための供給源として働く。したがって、コエンザイム Q 1 0 で誘導される A C L 発現の変化は、癌細胞に対して正常細胞における脂質およびコレステロールの合成のためのアセチル C o A の利用可能性を変化させる。結果を、以下の表 3 4 ~ 3 7 にまとめる。

30

40

【表 3 4】

表 3 4 : H D F a 中の A T P C L および M C F - 7 中の A T P C L

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

10

【表 3 5】

表 3 5 : H e p G 2 の A T P クエン酸リアーゼ (A T P C i t r a t e L y s a s e) のおおよそのバンドの大きさ (k d) に対する H A S M C 中の A T P クエン酸リアーゼのおおよそのバンドの大きさ (k d)

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

20

【表 3 6】

表 3 6 : P A C A 2 中の A T P クエン酸リアーゼ (A T P C i t r a t e L y s a s e) のおおよそのバンドの大きさ (k d) に対する H A S M C 中の A T P クエン酸リアーゼのおおよそのバンドの大きさ (k d)

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

30

40

【表 37】

表 37 : CTRL の百分率 (%) としての、Hep G 2 中の ATP クエン酸リアーゼ (ATP Citrate Lyase) および PACA 2 中の ATP クエン酸リアーゼ

量-組成	標準化強度
PACA 5 g 48-培地	1. 00
PACA 5 g 48-50-コエンザイム Q10	0. 68
PACA 5 g 48-100-コエンザイム Q10	0. 42
PACA 22 G 48-培地	1. 00
PACA 22 G 48-50-コエンザイム Q10	1. 12
PACA 22 G 48-100-コエンザイム Q10	1. 74
Hep 5 g 48-培地	1. 00
Hep 5 g 48-50-コエンザイム Q10	0. 85
Hep 5 g 48-100-コエンザイム Q10	0. 79
Hep 22 G 48-培地	1. 00
Hep 22 G 48-50-コエンザイム Q10	1. 29
Hep 22 G 48-100-コエンザイム Q10	2. 09

10

【0531】

ピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2)

ピルビン酸キナーゼは、解糖経路に関わる酵素である。これは、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) からアデノシン二リン酸 (ADP) へのリン酸の転移の原因であり、ATP およびピルビン酸を生成する。PKM2 は、解糖のピルビン酸キナーゼのアイソザイムであり、その発現は組織の代謝機能によって特徴付けられ、すなわち、M2 アイソザイムは、胚細胞などの高いエネルギーの必要性を伴う正常細胞を迅速に増殖させる際に発現され、高い率の核酸合成を必要とする肺細胞および膵島細胞などの少数の分化した正常細胞においてもまた発現される。PKM2 は、細胞のエネルギーの要求に合致するために解糖経路に対するそれらの依存性に起因して、腫瘍細胞中で高度に発現されている。通常は胚に限定されていると考えられている PKM2 アイソフォームは、癌性細胞中で再発現されている。PKM2 を発現する細胞は、より強力な好気性解糖表現型を好み (代謝表現型のシフトを示す)、乳酸産生の増加および酸化的リン酸化の減少を伴う。したがって、癌細胞における PKM2 の発現の減少は、解糖経路を経由してエネルギー生成をシフトまたは下方調節し、これは、癌の処置において有用である戦略である。データは、正常細胞および癌細胞における PKM2 の変動する発現パターンを実証し、癌細胞は正常と比較してより高いレベルの発現を実証する。コエンザイム Q10 での細胞の処置は、正常細胞および癌細胞において、PKM2 のより上側のおよびより下側のバンドレベルの発現パターンを変化させた。試験された癌細胞において PKM2 発現の用量依存的な減少が存在し、および癌細胞において大きな変化は観察されなかった。結果を、以下の表 38~40 にまとめる。

20

30

【表 38】

表 38 : Hep G 2 中の 2 つの上部のバンド由来の筋ピルビン酸キナーゼ

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

40

【表 3 9】

表 3 9 : H e p G 2 中の 2 つの下部のバンド (5 8 K D) 由来の筋ピルビン酸キナーゼ

量-組成	標準化体積 (2 4 時間)	標準化体積 (4 8 時間)
5 g - 培地	1 0 4 8 3	3 1 0
5 g - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	1 1 1 9 7	1 8 5
5 g - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	7 6 4 2	1 2 2
2 2 G - 培地	9 1 5 0	3 0 6
2 2 G - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	6 3 0 2	3 4 4
2 2 G - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	6 9 0 4	4 6 5

10

【表 4 0】

表 4 0 : 処理後の H A S M C 細胞中の 2 つの上部のバンド由来の筋ピルビン酸キナーゼ

量-組成	標準化強度
5 g 4 8 - 培地	6 0 8
5 g 4 8 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	8 1 1
5 g 4 8 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	6 1 1
2 2 G 4 8 - 培地	5 1 6
2 2 G 4 8 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	5 9 5
2 2 G 4 8 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	4 9 6
2 2 G 2 4 - 培地	3 0 1
2 2 G 2 4 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	4 7 7
2 2 G 2 4 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	7 0 1

20

【 0 5 3 2】

乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H)

L D H は、N A D H および N A D ⁺ の同時相互変換を伴う、ピルビン酸および乳酸の相互交換を触媒する酵素である。これは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を負担して、還元当量の生成および A T P 生成のための低い細胞酸素の緊張の下で、ピルビン酸をラクテート (乳酸) に転換する能力を有する。癌細胞は、典型的には、A T P および還元当量および還元ミトコンドリア O X P H O S を生成するために解糖流入を維持するために L D H の発現の増加を実証する。したがって、癌細胞における還元当量は、T C A 回路にピルビン酸が入ることを容易にするための乳酸の生成から代謝をシフトする。コエンザイム Q 1 0 を用いる処置は、癌における乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) 発現を減少させ、これは正常細胞においては最小の効果を伴うものであり、細胞質ピルビン酸から乳酸への転換を最小化することによって、解糖からミトコンドリア O X P H O S への A T P の生成のための癌細胞の生体エネルギーのシフトを誘発する際のコエンザイム Q 1 0 の役割を支持する。結果を、以下の表 4 1 ~ 4 3 にまとめる。

30

【表 4 1】

表 4 1 : H e p G 2 中の乳酸デヒドロゲナーゼ

量-組成	標準化体積 (2 4 時間)	標準化体積 (4 8 時間)
5 g - 培地	7 9 8 1	5 9 9 7
5 g - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	7 9 0 0	5 1 8 8
5 g - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	6 6 1 6	7 3 1 9
2 2 G - 培地	9 1 7 1	7 5 2 7
2 2 G - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	7 5 5 0	6 1 7 3
2 2 G - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	7 1 2 4	9 1 4 1

40

【表 4 2】

表 4 2 : 2 回の実験による、対照に対する百分率 (%) としての H e p G 2 中の乳酸デヒドロゲナーゼ

量-組成	対照%としての平均体積
5 g 2 4 - 培地	1. 0 0
5 g 2 4 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	0. 6 4
5 g 2 4 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	1. 0 6
5 g 4 8 - 培地	1. 0 0
5 g 4 8 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	1. 1 2
5 g 4 8 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	1. 2 1
2 2 G 2 4 - 培地	1. 0 0
2 2 G 2 4 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	1. 2 1
2 2 G 2 4 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	1. 4 4
2 2 G 4 8 - 培地	1. 0 0
2 2 G 4 8 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	0. 9 5
2 2 G 4 8 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	0. 6 7

10

【表 4 3】

表 4 3 : P A C A 2 中の乳酸デヒドロゲナーゼ

量-組成	標準化体積 (2 4 時間)	標準化体積 (4 8 時間)
5 g - 培地	2 1 2 2	2 3 6 0
5 g - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	5 0 6 8	2 9 7 8
5 g - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	3 6 7 5	2 3 9 6
2 2 G - 培地	4 4 9 9	2 3 3 2
2 2 G - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	1 0 2 1 8	2 5 7 5
2 2 G - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	7 1 5 8	3 5 5 7

20

【0 5 3 3】

ピルビン酸デヒドロゲナーゼー B (P D H - E 1)

ピルビン酸デヒドロゲナーゼベータ (P D H - E 1) は、ピルビン酸をアセチル C o A に転換するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (P D C) の一部である第 1 の酵素成分である。 P D H - E 1 は、その活性のためにチアミンをコファクターとして必要とし、ミトコンドリアにおける T C A サイクルに入るためにピルビン酸からアセチル C o A への転換のために必須である P D C 複合体における最初の 2 つの生化学反応を実施する。したがって、癌細胞における P D H - E 1 の発現の増加に伴って、同時に起こる P K M 2 および L D H の発現の減少は、 A T P の生成のためにミトコンドリア O X P H O S を増強することに向けてピルビン酸が入ることの速度を増強する。データは、正常細胞および癌細胞系統における P D H - E 1 の発現のために、この酵素のベースライン発現が、正常細胞と比較して、癌細胞で減少されていることを示す。コエンザイム Q 1 0 を用いる処置は、癌細胞における P D H - E 1 タンパク質の発現の進行的な増加に関連し、正常細胞においては最小限の変化を伴う。結果を、以下の表 4 4 ~ 4 6 にまとめる。

30

40

【表 4 4】

表 4 4 : H e p G 2 中のビルビン酸デヒドロゲナーゼ β

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

10

【表 4 5】

表 4 5 : P A C A 2 中のビルビン酸デヒドロゲナーゼ β

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

20

【表 4 6】

表 4 6 : 処理後の H A S M C 中のビルビン酸デヒドロゲナーゼ β

量-組成	標準化体積
5 g 48-培地	140
5 g 48-50-コエンザイムQ10	147
5 g 48-100-コエンザイムQ10	147
22 G 48-培地	174
22 G 48-50-コエンザイムQ10	149
22 G 48-100-コエンザイムQ10	123
22 G 24-培地	140
22 G 24-50-コエンザイムQ10	145
22 G 24-100-コエンザイムQ10	150

30

【0534】

カスパーゼ 3

アポトーシスの開始の制御は、しばしば、開始因子のカスパーゼである、カスパーゼ 2、-9、および-8/10 のレベルで発揮される。外部のアポトーシスの経路において、カスパーゼ-8 は、一旦活性になると、実行因子のカスパーゼ（例えば、カスパーゼ 3）を直接切断し、活性化する。活性型カスパーゼ-3 は、他のカスパーゼ（6、7、および 9）ならびに細胞中の関連する標的（例えば、PARP および DFF）を活性化する。これらの研究において、エフェクターカスパーゼ-3 タンパク質のレベルは、コエンザイム Q10 に応答して、癌細胞系統および正常細胞系統において測定された。アポトーシスの制御は開始因子カスパーゼを通してであり、その代わりに、多数のシグナル伝達経路が、エフェクターカスパーゼの直接阻害を通してアポトーシスシグナルの伝達を遮断することが注目されるべきである。例えば、P38 MAPK は、カスパーゼ-3 をリン酸化し、その活性を抑制する (Alvarado-Kristensson et al., 2004)。興味深いことに、同じ研究におけるタンパク質ホスファターゼ (PP2A) またはプロテインキナーゼ C デルタ (PKC デルタ) の活性化 (Voss et al.,

40

50

， 2005）は、カスパーゼー3活性化を増幅し、そしてアポトーシスシグナルの伝達を強化するように、p38 MAPKの効果と反対に作用できる。それゆえに、カスパーゼー3活性化のレベルにおける事象またはカスパーゼ3活性化後の事象は、いくつかの場合において細胞の究極の運命を決定するかもしれない。

【0535】

カスパーゼー3はシステインーアスパラギン酸プロテアーゼであり、これは、細胞アポトーシスの実行フェーズで中心的な役割を果たす。癌細胞におけるカスパーゼ3のレベルは、コエンザイムQ10処置に伴って増加される。対照的に、正常細胞におけるカスパーゼー3の発現は、正常細胞において中程度に減少された。結果を、以下の表47～49にまとめる。

【表47】

表47：PACA2中のカスパーゼ3

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

【表48】

表48：2回の実験による、対照に対する百分率（%）としてのHe p G 2中のカスパーゼ3

量-組成	対照の%としての標準化体積
5g24-培地	1.00
5g24-50-コエンザイムQ10	1.08
5g24-100-コエンザイムQ10	1.76
5g48-培地	1.00
5g48-50-コエンザイムQ10	1.44
5g48-100-コエンザイムQ10	0.95
22G24-培地	1.00
22G24-50-コエンザイムQ10	1.39
22G24-100-コエンザイムQ10	1.78
22G48-培地	1.00
22G48-50-コエンザイムQ10	1.50
22G48-100-コエンザイムQ10	1.45

【表 4 9】

表 4 9 : 処理後の H A S M C 中のカスパーゼ 3

量一組成	標準化体積
5 g 4 8 - 培地	6 5 8
5 g 4 8 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	7 6 6
5 g 4 8 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	6 6 9
2 2 G 4 8 - 培地	8 4 6
2 2 G 4 8 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	6 3 9
2 2 G 4 8 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	6 2 4
2 2 G 2 4 - 培地	9 8 2
2 2 G 2 4 - 5 0 - コエンザイム Q 1 0	8 3 5
2 2 G 2 4 - 1 0 0 - コエンザイム Q 1 0	8 6 5

10

【0 5 3 6】

コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH)

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

20

【0 5 3 7】

ウェスタンブロッティング分析は、コエンザイム Q 1 0 で処置された癌細胞のミトコンドリア調製物において SDH サブユニット B の発現を特徴付けるために使用された。結果は、コエンザイム Q 1 0 処置が、細胞のミトコンドリアにおける SDH タンパク質レベルの増加に関連することを示唆する。これらの結果は、コエンザイム Q 1 0 の作用のメカニズムの 1 つが T C A 回路およびミトコンドリアに向かう細胞の代謝を、SDH B などのミトコンドリア酵素のレベルを増加することによってシフトされることを示唆する。結果は以下の表 5 0 に要約される。

30

【表 5 0】

表 5 0 : N C I E 0 8 0 8 M i t o p r e p s 中のコハク酸デヒドロゲナーゼ B

組成-時間	平均標準化体積
培地	5 3 1
5 0 uM コエンザイム Q 1 0、3 時間	6 3 4
1 0 0 uM コエンザイム Q 1 0、3 時間	9 6 4
5 0 uM コエンザイム Q 1 0、6 時間	1 0 7 7
1 0 0 uM コエンザイム Q 1 0、6 時間	9 3 4

40

【0 5 3 8】

低酸素誘導因子-1

低酸素誘導因子 (H i f) は、 α および β サブユニットから構成される転写因子である。酸素正常状態下では、H i f 1 α のタンパク質レベルは、翻訳後事象の結果を介するその連続的な分解により、非常に低い。解糖と酸化的リン酸化の間のシフトは、一般的には、ピルビン酸の異化的な運命を決定する 2 つの酵素 P D H および L D H の相対的な活性によって制御されると考えられる。H i f は、P D K を刺激することによって、L D H レベルを誘導し、P D H 活性を阻害することによって、この決定的な分岐 (b i f u r g a t i o n) 点を制御する。ミトコンドリアから細胞質ゾルにピルビン酸代謝を迂回させるこ

50

の能力により、H i f は、癌細胞における生体エネルギーのスイッチの決定的な媒介因子であると考えられる。

【0539】

コエンザイムQ10での処置は、癌細胞のミトコンドリア調製物において、後でのH i f 1 α タンパク質レベルを減少させた。正常細胞の全細胞溶解物において、H i f 1 α の下側のバンドが観察され、同様に減少を示した。結果を、以下の表51～52にまとめる。

【表51】

表51：処理後のHASMC細胞中のH i f 1 α の下部のバンド

量一組成	標準化体積
5 g 48-培地	22244
5 g 48-50-コエンザイムQ10	21664
5 g 48-100-コエンザイムQ10	19540
22 G 48-培地	14752
22 G 48-50-コエンザイムQ10	17496
22 G 48-100-コエンザイムQ10	23111
22 G 24-培地	21073
22 G 24-50-コエンザイムQ10	18486
22 G 24-100-コエンザイムQ10	17919

10

20

【表52】

表52：処理後のHepG2中のH i f 1 α の上部のバンド

量一組成	標準化体積
5 g 24-培地	12186
5 g 24-50-コエンザイムQ10	8998
5 g 24-100-コエンザイムQ10	9315
5 g 48-培地	8868
5 g 48-50-コエンザイムQ10	8601
5 g 48-100-コエンザイムQ10	10192
22 G 24-培地	11748
22 G 24-50-コエンザイムQ10	14089
22 G 24-100-コエンザイムQ10	8530
22 G 48-培地	8695
22 G 48-50-コエンザイムQ10	9416
22 G 48-100-コエンザイムQ10	5608

30

【0540】

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

40

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

【0541】

出願人は、癌細胞中のCoQ10での処置が、解糖および乳酸生合成の同時に起こる減少を伴う、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を増強する特定のタンパク質の発現の変化と関連することを先のセクションで実証した。この実施例は、インビトロ実験モデルにお

50

る溶存酸素および細胞外pHレベルを測定する機器であるSeaHorse XF分析装置 (SeaHorse Biosciences Inc, North Billerica, MA) を使用して細胞系統において酸素消費速度 (OCR) を測定することによって、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の直接測定を得ることができることを示す。

【0542】

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

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

【0543】

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

【0544】

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

【0545】

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

【0546】

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

【0547】

それらのそれぞれの生理学的役割 (すなわち、HDFaおよびHASMC) の違いは、SeaHorse XF分析装置を使用してこれらの細胞系統において測定される休止状態のOCR値で観察された。図29および30は、生理学的に正常なグルコース条件 (約4.6mM) および高グルコース (高血糖) 条件において増殖したHDFaおよびHASMC細胞におけるOCRを記載する。

【0548】

通常の酸素利用能の下での任意の処置の非存在下でのHDFaについてのベースライン

10

20

30

40

50

OCR値は、5.5 mMグルコースの存在下で約40 pモル/分である（図29）。この値は、細胞が2.2 mM グルコースに維持されたときにわずかに上昇された。対照的に、HASMC細胞において、5.5 mM グルコースにおけるOCR値は約90ピコモル/分であり、OCR値は、2.2 mM グルコースの間に約40ピコモル/分まで下降した。したがって、高血糖条件下では、HDFaとHASMCの間の示差的な応答が存在し、それらのそれぞれの生理学的な構成および機能における固有の違いをさらに実証する。

【0549】

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

【0550】

以下の表53は、5.5 mMおよび2.2 mMグルコースにおける正常酸素および低酸素条件下でのCoQ10の存在下または非存在下でのHDFa細胞におけるECAR値（m pH/分）を記載する。正常細胞において、CoQ10での処置は、それがたとえこれらの細胞においてOCRに影響を与えたとしても、ECAR値に対して最小限の影響を有したことが観察できる。高グルコース低酸素条件において、CoQ10での処置は、未処置の正常酸素条件において観察された値までの、上昇したECARの低下に関連した。

【表53】

表53：5.5 mMおよび2.2 mMのグルコースの正常酸素圧条件および低酸素条件下、CoQ10の非存在下および存在下にあるHDFa細胞中のECAR値

	正常酸素 (5.5 mM)		低酸素 (5.5 mM)		正常酸素 (2.2 mM)		低酸素 (2.2 mM)	
処置	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
未処置	5	1.32	5	0.62	5	0.62	9	0.81
50 μ M 31510	6	1.11	5	0.78	5	0.78	6	0.70
100 μ M 31510	6	0.76	5	1.19	5	1.19	8	1.07

【0551】

表54において、HASMCにおける測定されたベースラインECAR値（m pH/分）はHDFaのそれと比較して高かった。低酸素状態の誘導は、解糖の増加に続いて起こる細胞内低酸素誘導性アシドーシスと関連する可能性が最も高いECARの増加を引き起こした。

【表54】

表54：5.5 mMおよび2.2 mMのグルコースの正常酸素圧条件および低酸素条件下、CoQ10の非存在下および存在下にあるHASMC細胞中のECAR値

	正常酸素 (5.5 mM)		低酸素 (5.5 mM)		正常酸素 (2.2 mM)		低酸素 (2.2 mM)	
処置	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
未処置	9	2.22	11	2.18	22	2.08	19	1.45
50 μ M 31510	9	2.13	11	2.54	21	1.72	17	1.60
100 μ M 31510	9	1.72	13	2.30	22	1.64	17	1.47

【0552】

CoQ10での処置は、正常酸素での正常グルコース条件において観察される値に向け

た低酸素条件における高血糖H A S M C細胞におけるE C A R速度の下向きの傾向と関連することが観察された。これらのデータは、特定の細胞の型の生理学的役割に固有である生理学的変数、異常な状態において観察される変化（例えば、高血糖）の存在が、C o Q 1 0で処置されたときに正常に向けてシフトされることを実証する。

【0553】

対照的に、癌細胞（例えば、M C F - 7、P a C a - 2）は、培養中の維持のための解糖表現型に起因して、正常細胞と比較してより高いレベルのグルコースでの培養に固有に準備されている。C o Q 1 0での処置は、O C R値の一貫した減少を引き起こした（図31および図32）。

【0554】

M C F - 7およびP a C a - 2細胞におけるO C R値に対するC o Q 1 0の効果は、正常H D F aおよびH A S M C細胞のそれと類似しており、この変動性応答は、癌細胞系統の個々の代謝プロフィールに基づいて治療応答を示唆するものであった。

【表55】

表55：5.5 mMおよび22 mMのグルコースの正常酸素圧条件および低酸素条件下、C o Q 1 0の非存在下および存在下にあるP a C a - 2細胞中のE C A R値

処置	正常酸素 (17 mM)		低酸素 (17 mM)		正常酸素 (22 mM)		低酸素 (22 mM)	
	E C A R	S E M	E C A R	S E M	E C A R	S E M	E C A R	S E M
未処置	21	5.97	16	3.41	24	4.35	36	5.65
50 μ M 31510	13	3.08	12	1.66	20	5.15	25	4.58
100 μ M 31510	14	2.14	17	2.59	19	3.38	30	5.62

【0555】

表55は、P a C a - 2細胞におけるE C A R値を記載する。正常細胞と比較して、癌細胞は、A T P生成のために高グルコースを使用するように表現型的に準備されており（解糖の増強）、21 m p H / 分でより高いE C A Rを生じる（表55、未処置正常酸素についてのE C A R 17 mM）。C o Q 1 0での処置は、解糖で生成された乳酸の減少に付随する可能性が最も高い、これらの条件下でのE C A R速度の有意な減少を生じる。これらの細胞におけるO C Rの関連する減少は、ミトコンドリアO X P H O Sの効率の増加と最も関連したようであった。

【0556】

O C RおよびE C A Rの同様の比較（データ示さず）は、H A E C（正常ヒト大動脈内皮細胞）、M C F - 7（乳癌）、H e p G 2（肝臓癌）、および高度に転移性のP C - 3（前立腺癌）細胞系統を含む多数の他の正常細胞および癌細胞において決定された。試験された細胞系統のすべてにおいて、ストレッサー（例えば、高血糖、低酸素、乳酸）の非存在下および／または存在下でのC o Q 1 0への曝露は、正常の生理学的条件下での正常細胞において観察される値に代表的なO C RおよびE C A Rの値のシフトと関連した。したがって、細胞死を含む、癌の処置におけるC o Qの全体的な効果は、解糖からミトコンドリアO X P H O Sへの細胞の生体エネルギーのシフトと協調した、プロテオミクスの、ゲノムの、代謝学な結果に対するその集合的な影響の下流の効果である。

【0557】

実施例23 C o Q 1 0の生合成のためのビルディングブロック分子

この実施例は、C o Q 1 0生合成の特定の前駆体、例えば、ベンゾキノン環の生合成のためのもの、およびイソプレノイド反復の生合成のためのもの、ならびにベンゾキノン環へのそれらの付属物（「ビルディングブロック成分」）が、単独で投与でき、もしくは標的細胞と組み合わせて投与でき、ならびにアポトーシス阻害剤B c l - 2の下方調節、および／またはアポトーシス促進因子カスパーゼ-3の上方調節をもたらすことを実証する

。特定の前駆体またはそれらの組み合わせは、細胞増殖もまた阻害し得る。データは、C o Q 1 0 投与と実質的に同じ結果を達成するために、C o Q 1 0 前駆体がC o Q 1 0 の代わりに使用されてもよいことを示唆する。

【0558】

実験において使用された特定の例示的な実験条件は以下に列挙される。

【0559】

S k m e l - 2 8 黒色腫細胞は、5 % ウシ胎仔血清 (F B S) および1×最終濃度の抗生物質を補充したD M E M / F 1 2 中で培養された。細胞は、85 % コンフルエンシーまで増殖され、3、6、12、および24時間の間、ビルディングブロック成分で処置された。次いで、細胞はペレット化され、ウェスタンブロット分析が実施された。

10

【0560】

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

【0561】

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

20

【0562】

実験の例証的な結果は以下に要約される。

【0563】

ビルディングブロック成分L-フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：キノン環構造についての合成経路に着手する前に、L-フェニルアラニンがチロシンに転換される。ウェスタンブロット分析は、黒色腫細胞におけるアポトーシスタンパク質の発現の任意の変化を定量するように実施された。試験された濃度は5 μ M、25 μ M、および100 μ Mであった。初期の研究は、0.4 Mの濃度のフェニルアラニンを含んだD M E M / F 1 2 培地にL-フェニルアラニンを加えた。5 μ M、25 μ M、および100 μ Mについては、培地中のL-フェニルアラニンの最終濃度は、それぞれ、0.405 M、0.425 M、および0.500 Mであった。これらの最終濃度は、3、6、12、および24時間のインキュベーション時間の間、S k m e l - 2 8 細胞に対して試験された。細胞は、80 % コンフルエンシーまで増殖され、その後、処置培地を加え、上記のようにウェスタンブロット分析手順を使用して収穫された。統計学的に有意なB c l - 2 の減少は、3時間および12時間のインキュベーション後に、100 μ M L-フェニルアラニンについて観察された。5 μ M L-フェニルアラニンについては、統計学的に有意なB c l - 2 の減少は、インキュベーションの6時間後に観察された。25 μ M L-フェニルアラニンについては、統計学的に有意なB c l - 2 の減少、および統計学的に有意なカスパーゼ3の増加が12時間のインキュベーション後に観察された。統計学的に有意なB c l - 2 の減少は、アポトーシス能力の変化を示し、統計学的に有意なカスパーゼ3の増加は細胞がアポトーシスを受けていることを確認する。たとえ試料サイズおよび標準偏差に起因して、この実験においてこれらの時点は統計学的に有意ではないとしても、対照と比較してB c l - 2 の減少の一定の傾向が存在した。

30

40

50

【0564】

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

【0565】

ビルディングブロック成分DL-フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：DL-フェニルアラニンもまた、L-フェニルアラニンとの比較のために試験された。再度、5 μ M、25 μ M、および100 μ Mの濃度がSkme1-28細胞に対して試験された。インキュベーション時間は、3、6、12、および24時間であった。統計学的に有意なカスパーゼ-3の増加が3時間のインキュベーション後に観察された。統計学的に有意なBcl-2の減少が24時間のインキュベーション後に観察された。Bcl-2の減少およびカスパーゼ-3の増加の傾向が、すべての他の濃度およびインキュベーション時点であるが、これらは、この実験においては統計学的に有意ではなかった。

【0566】

ビルディングブロック成分L-チロシンのウェスタンブロット分析：L-チロシンはCoQ10のキノン環構造の合成のためのビルディングブロック成分である。L-チロシンの初期の試験は、ウェスタンブロット分析のために十分に高いタンパク質濃度を生じなかった。この研究から25 μ Mより下の濃度がウェスタンブロット分析のために試験された。使用されたDMEM/F12培地は、0.398467MのL-チロシン二ナトリウム塩を含んだ。初期濃度は500 nM、5 μ M、および15 μ M増加された。統計学的に有意なカスパーゼ-3の増加は、12時間のインキュベーション後に500 nM濃度について観察された。統計学的に有意なカスパーゼ-3の増加もまた、5Aについて観察され、統計学的に有意なBcl-2の減少は、24時間のインキュベーション後に5 μ M濃度について観察された。統計学的に有意なBcl-2の減少は、24時間のインキュベーション後に500 μ Mおよび5 μ M濃度について観察された。

【0567】

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

【0568】

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

【0569】

ビルディングブロック成分4-ヒドロキシフェニルピルビン酸のウェスタンブロット分析：4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は、アミノ酸であるチロシンおよびフェニル

10

20

30

40

50

アラニンから誘導され、環構造の合成において役割を果たす可能性がある。1 μ M、5 μ M、および15 μ Mの濃度がB c 1-2およびカスパーゼ-3発現のために試験された。5 μ Mおよび15 μ M濃度について、24時間のインキュベーション後にB c 1-2発現の有意な減少が存在し、12時間のインキュベーション後にカスパーゼ-3発現の有意な増加が存在した。

【0570】

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

10

【0571】

ビルディングブロック成分3-メトキシ4-ヒドロキシマンデル酸（バニルマンデル酸またはVMA）のウェスタンブロット分析：VMAは、C o Q 10キノン環構造の合成のためのさらなる成分である。試験された濃度は100 nM、250 nM、500 nM、1 μ M、25 μ M、50 μ M、および100 μ Mであった。統計学的に有意なアポトーシス効果はこの実験において観察されなかったが、データはB c 1-2発現の下向きの傾向を示した。

20

【0572】

ビルディングブロック成分バニリン酸のウェスタンブロット分析：バニリン酸（Vanillic）はキノン環の合成のための前駆体であり、500 nM、5 μ M、および15 μ Mの濃度で試験された。ウェスタンブロット分析は、B c 1-2およびカスパーゼ-3発現を測定した。バニリン酸は24時間インキュベーション時点での500 nMおよび5 μ Mの濃度についてB c 1-2発現を有意に減少することが示された。15 μ M濃度について、3時間のインキュベーション後にB c 1-2発現の減少が存在した。24時間、15 μ Mとともにインキュベートした細胞において、カスパーゼ-3発現の有意な増加が存在した。

【0573】

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

30

【0574】

ビルディングブロック成分4-ピリドキシンのウェスタンブロット分析：ピリドキシンはC o Q 10のキノン環構造の合成のための別の前駆体ビルディングブロックである。この化合物のために試験された濃度は、5 μ M、25 μ M、および100 μ Mである。細胞はB c 1-2およびカスパーゼ-3のそれらのレベルについてアッセイされた。ピリドキシンは黒色腫細胞中での24時間のインキュベーション後にB c 1-2の有意な減少を示した。

40

【0575】

ビルディングブロック成分パンテノールのウェスタンブロット分析：パンテノールはC o Q 10のキノン環構造の合成において役割を果たす。黒色腫細胞に対して試験された濃度は5 μ M、25 μ M、および100 μ Mである。この化合物は、25 μ M濃度についてB c 1-2発現の有意な減少を示した。

【0576】

ビルディングブロック成分メバロン酸（Mevalonic）のウェスタンブロット分析：メバロン酸はC o Q 10の合成のための主要な成分の1つである。この化合物は、500 nM、1 μ M、25 μ M、および50 μ Mの濃度で試験された。この実験において、

50

B c 1-2 発現の有意な減少またはカスパーゼ-3 発現の有意な増加は存在しなかった。

【0577】

ビルディングブロック成分アセチルグリシンのウェスタンブロット分析：C o Q 10 の合成のための別の経路は、イソプレノイド（側鎖）合成である。アセチルグリシンの付加は、コエンザイム A をアセチル-C o A に転換し、これは、イソプレノイド合成のためのメバロン酸経路に入る。試験された濃度は 5 μ M、25 μ M、および 100 μ M であった。アセチルグリシンの試験は、5 μ M および 25 μ M の濃度についての 12 時間のインキュベーション後に B c 1-2 発現の有意な減少を示した。B c 1-2 の有意な減少は、24 時間インキュベーションの時点で 100 μ M 濃度について記録された。

【0578】

ビルディングブロック成分アセチル-C o A のウェスタンブロット分析：アセチル-C o A は C o Q 10 の合成のためのメバロン酸経路のための前駆体である。試験された濃度は 500 nM、1 μ M、25 μ M、および 50 μ M であった。試験された時点および濃度について、B c 1-2 発現の有意な減少またはカスパーゼ-3 発現の有意な増加は観察されなかった。

【0579】

ファルネシルと組み合わせたビルディングブロック成分 L-チロシンのウェスタンブロット分析：L-チロシンは、C o Q 10 のキノン環構造の合成のための前駆体の 1 つである。以前の実験は、L-フェニルアラニンおよび L-チロシンとの、培地中の L-チロシンの反応を試験した。本研究において、L-チロシンは、L-フェニルアラニンおよび L-チロシンの添加なしの培地中で試験された。本研究において、試験された L-チロシンの最終濃度は、500 nM、5 μ M、および 15 μ M であった。ファルネシルは、50 μ M の濃度で試験された。3 時間および 6 時間の時点について、有意な応答は観察されなかった。

【0580】

ファルネシルと組み合わせたビルディングブロック成分 L-フェニルアラニンのウェスタンブロット分析：キノン環構造の合成のための前駆体である L-フェニルアラニンは、L-チロシンおよび L-フェニルアラニンを含まない培地中でファルネシルと組み合わせて試験された。ウェスタンブロット分析は、B c 1-2 および カスパーゼ-3 の発現をアッセイするために実施された。L-フェニルアラニンの最終濃度は、5 μ M、25 μ M、および 100 μ M であった。ファルネシルは 50 μ M の濃度で加えられた。本研究は、以下の表に示されるような試験された濃度および組み合わせの多くについて B c 1-2 発現の減少を示した。

【0581】

L-フェニルアラニン	3 時間		6 時間		12 時間		24 時間	
	B c 1-2	C a s -3	B c 1-2	C a s -3	B c 1-2	C a s -3	B c 1-2	C a s -3
5 μ M	X							
5 μ M w / ファルネシル							X	X
25 μ M	X		X					
25 μ M w / ファルネシル	X							X
100 μ M	X		X				X	
100 μ M w / ファルネシル				X				

【0582】

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

【0583】

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

【0584】

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

【0585】

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

【0586】

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

【0587】

T-検定が、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとして実施された。Xは細胞数の統計学的減少を意味する。

【0588】

10

20

30

40

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

10

20

【0589】

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

【0590】

30

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

【0591】

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

【0592】

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

40

【0593】

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

10

20

30

【0594】

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

【0595】

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

40

【0596】

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

10

【0597】

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

20

【0598】

L-フェニルアラニン	対照との比較	L-フェニルアラニン対ベンゾキノンの化合物との比較	ベンゾキノンの対照との比較
5 μ M			
5 μ M w/ Benzo (50 μ M)		X	
5 μ M w/ Benzo (100 μ M)		X	
25 μ M			
25 μ M w/ Benzo (50 μ M)		X	
25 μ M w/ Benzo (100 μ M)		X	
100 μ M			
100 μ M w/ Benzo (50 μ M)	X	X	X
100 μ M w/ Benzo (100 μ M)	X	X	X

30

【0599】

同様の相乗作用的役割は、ベンゾキノンの組み合わせとL-フェニルアラニンについて見られる。

【0600】

L-フェニルアラニンのファルネシルとの組み合わせの細胞増殖アッセイ：ファルネシルと組み合わせるインキュベートされたL-フェニルアラニンの組み合わせ細胞増殖研究の予備的結果。L-フェニルアラニンは、対照およびファルネシル対照グループに対して比較された。Xは細胞数の統計学的減少を意味する。

40

【0601】

L-フェニルアラニン	対照との比較	L-フェニルアラニン対 ファルネシルなしの化合 物との比較	ファルネシル対照との比 較
5 μ M			
5 μ M w/ ファルネシル (5 0 μ M)			
5 μ M w/ ファルネシル (1 0 0 μ M)			
2 5 μ M	X		
2 5 μ M w/ ファルネシル (5 0 μ M)	X	X	X
2 5 μ M w/ ファルネシル (1 0 0 μ M)	X	X	X
1 0 0 μ M	X		
1 0 0 μ M w/ ファルネシル (5 0 μ M)	X		X
1 0 0 μ M w/ ファルネシル (1 0 0 μ M)	X		

10

【0602】

L-チロシンのベンゾキノンの組み合わせの細胞増殖アッセイ：L-チロシンはベンゾキノンと組み合わせてインキュベートされ、その後、細胞計数が実施された。グループは、対照グループおよびベンゾキノン対照グループと比較された。

【0603】

20

L-チロシン	対照との比較	L-チロシン対ベンゾキ ノンなしの化合物との比 較	ベンゾキノン対照との比 較
5 0 0 n m			
5 0 0 n m w/ B e n z o (5 0 μ M)			
5 0 0 n m w/ B e n z o (1 0 0 μ M)			
5 μ M	X		
5 μ m w/ B e n z o (5 0 μ M)	X		
5 μ m w/ B e n z o (1 0 0 μ M)	X		
1 5 μ M	X		
1 5 μ m w/ B e n z o (5 0 μ M)	X		
1 5 μ m w/ B e n z o (1 0 0 μ M)	x		

30

【0604】

ベンゾキノンの付加は、細胞数に対するL-チロシンの効果を増幅しなかった。

【0605】

L-チロシンのベンゾキノンの組み合わせの細胞増殖アッセイ：本研究は、L-チロシンのファルネシルとの組み合わせを試験した。グループは対照およびファルネシル対照グループと比較された。

40

【0606】

L-チロシン	対照との比較	L-チロシン対ファルネシルなしの化合物との比較	ファルネシル対照との比較
500 nm			
500 nm w/ ファルネシル (50 μ M)			
500 nm w/ ファルネシル (50 μ M)			
5 μ M	X		
5 μ M w/ ファルネシル (50 μ M)	X		
5 μ M w/ ファルネシル (100 μ M)	X		
15 μ M	X		
15 μ M w/ ファルネシル (50 μ M)	X		
15 μ M w/ ファルネシル (100 μ M)	X		

10

【0607】

L-チロシンおよびファルネシルを組み合わせることは、この実験において細胞数を減少させることに対して相乗作用を有するようには見えない。

【0608】

20

C o Q 10の合成は2つの主要部分に分けられ、これは、環構造の合成および側鎖構造の合成からなる。ここで、発癌性細胞は、側鎖および環構造の構成要素の合成のための前駆体である化合物が補充された。本発明者らの結果は、環構造、および側鎖構造への環構造の結合において役割を果たす2つの化合物の合成に関与する3つの主要な構成要素に研究の焦点を当ててきた。B c 1-2の有意な減少を示し、カスパーゼー3発現を増加するこれら3つの化合物は、1) L-フェニルアラニン、2) L-チロシン、および3) 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸である。側鎖の環構造への結合に関与する2つの化合物は、1) 4-ヒドロキシベンゾエートおよび2) フェニル酢酸である。

【0609】

本発明者らの結果はまた、2, 3 ジメトキシ5-メチル-p-ベンゾキノン（ベンゾキノン）と組み合わせたこれらの化合物の外因性送達、細胞増殖を有意に阻害することを示した。このことは、ベンゾキノン環への側鎖の結合のための化合物での環構造の補充は、損なわれたC o Q 10合成メカニズムを補充し得ることを示す。このことはまた、細胞プロセスによって必要とされる機能的特性を維持するために分子の安定化を補助し得る。フェニル酢酸は、4-ヒドロキシベンゾエートの合成のための前駆体であり、ベンゾキノンと組み合わせたこの外因性送達は、発癌性細胞において同様の効果を有する。

30

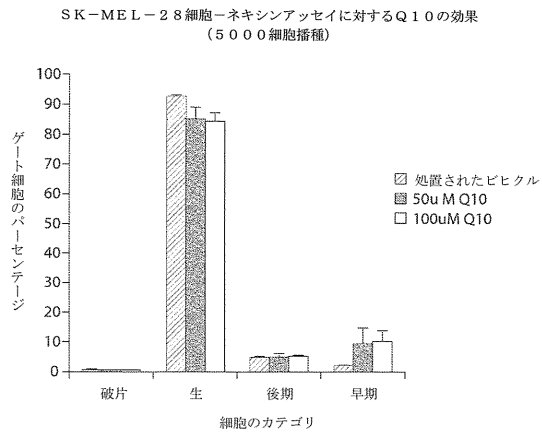
【0610】

等価物

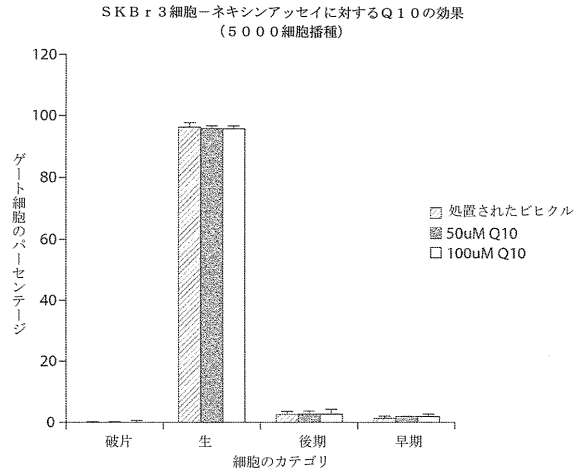
当業者は、日常的な範囲を超えない実験を使用して、本明細書に記載された特定の実施形態および方法の多くの等価物を認識し、またはそれを確認することが可能である。このような等価物は、添付の特許請求の範囲の範囲に包含されることが意図される。

40

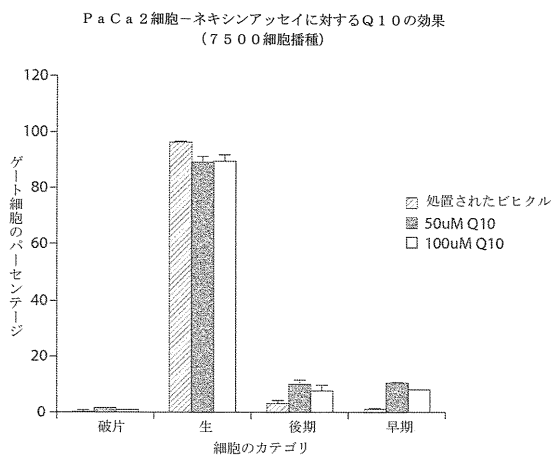
【図 1】



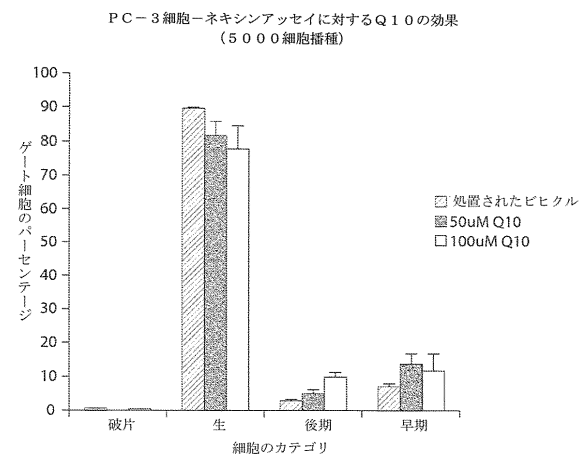
【図 2】



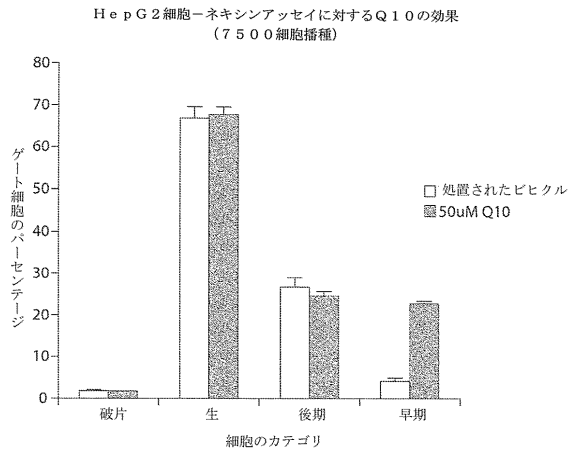
【図 3】



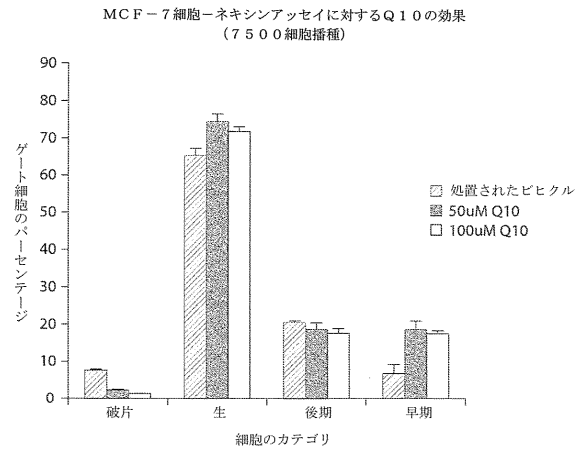
【図 4】



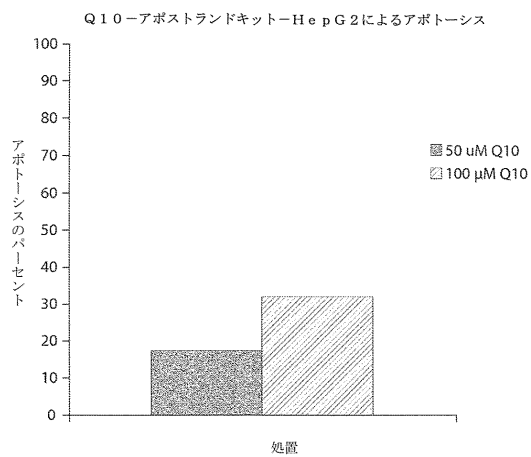
【図 5】



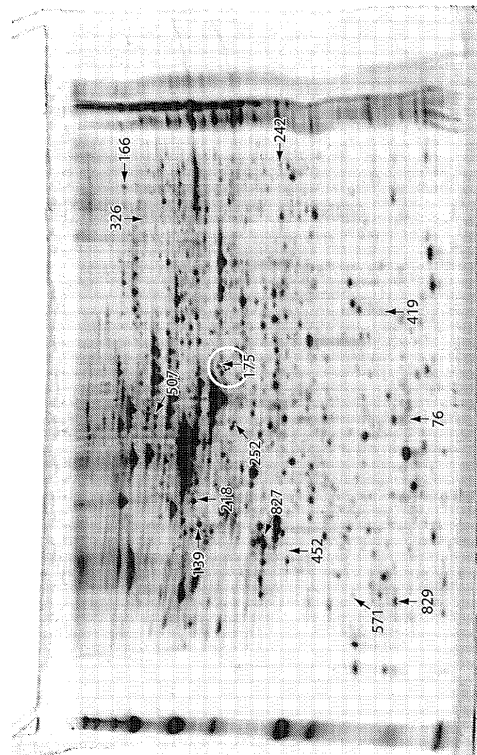
【図 6】



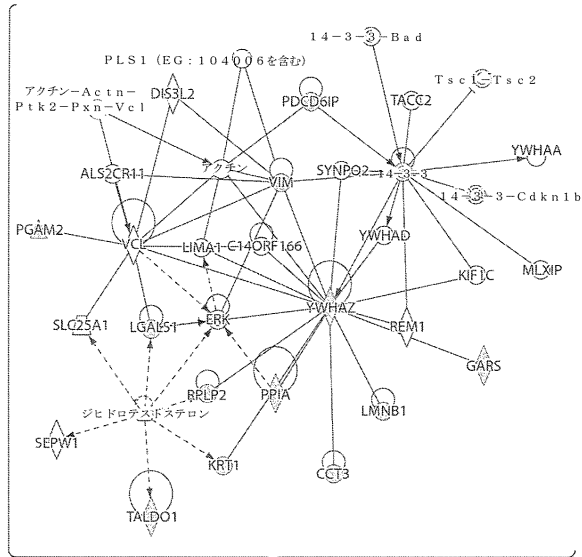
【図 7】



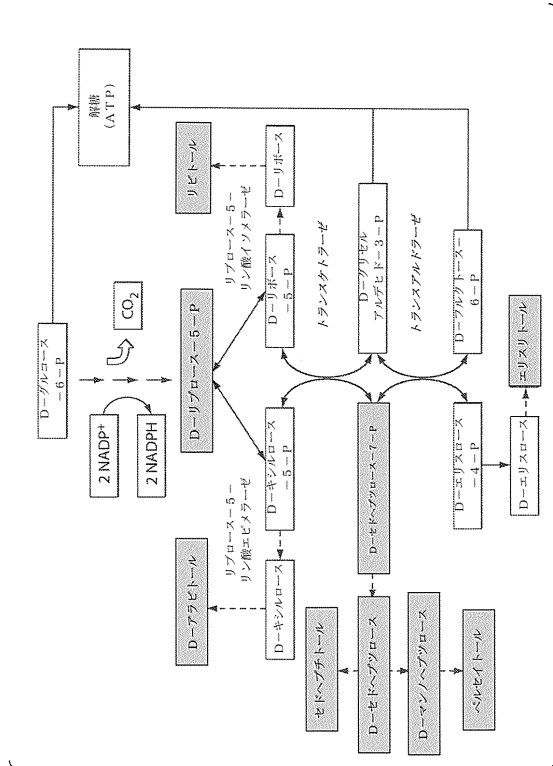
【図 8】



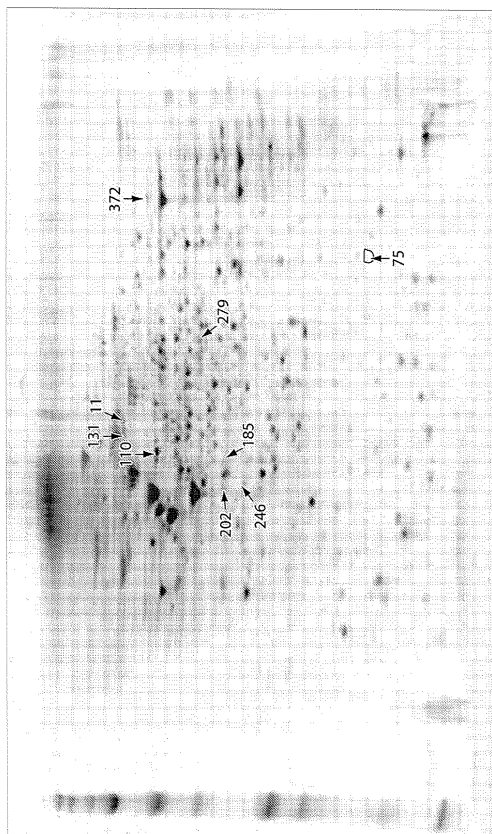
【図 9】



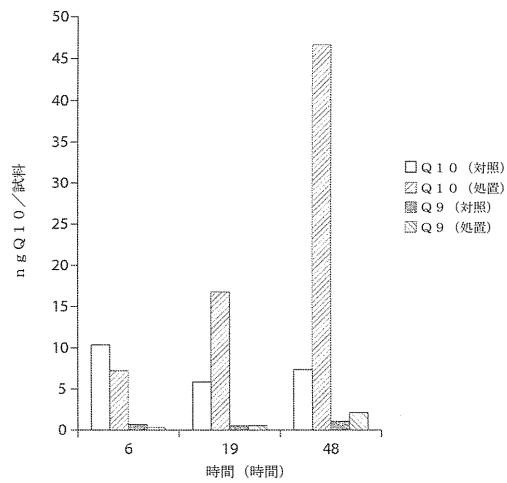
【図 10】



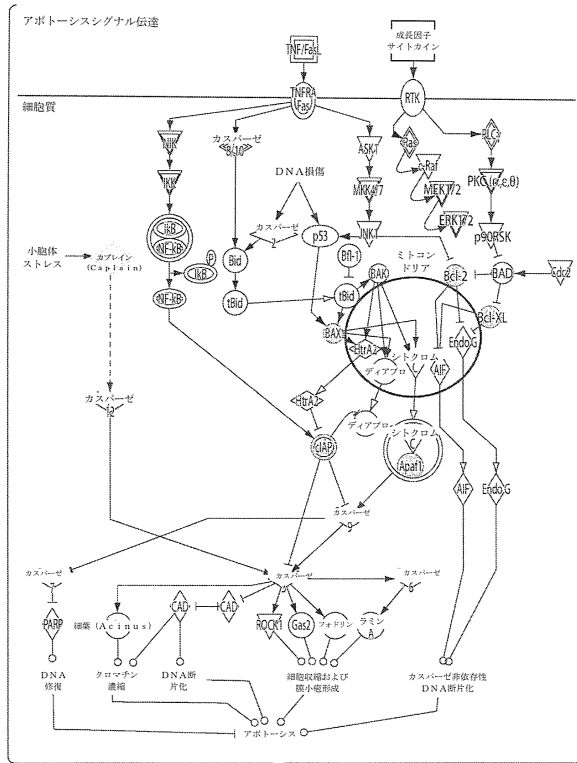
【図 11】



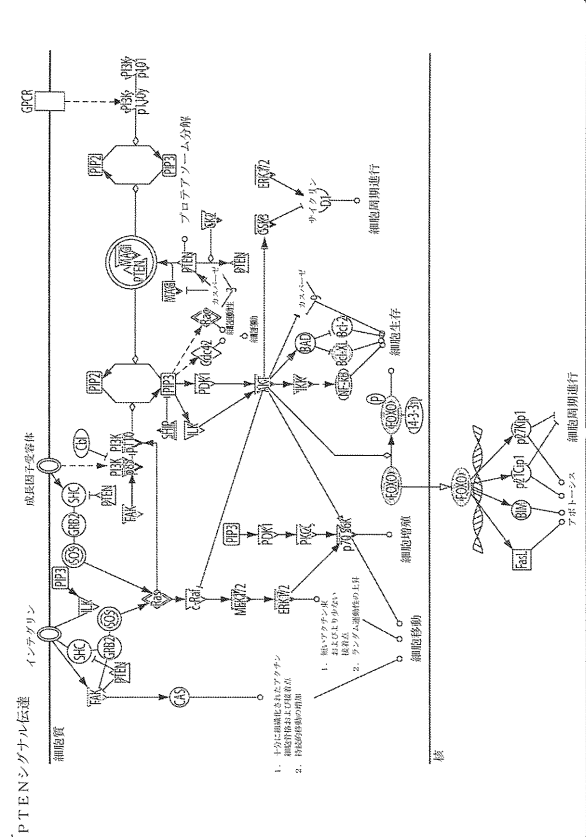
【図 12】



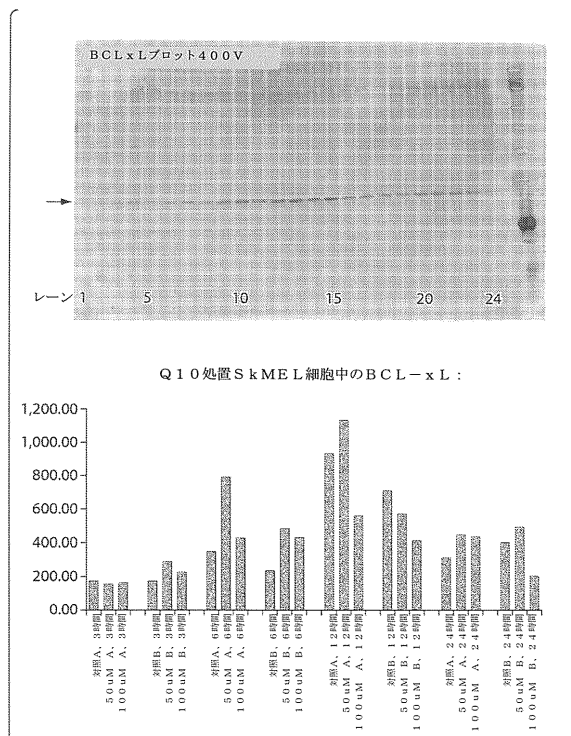
【図 1 3 A】



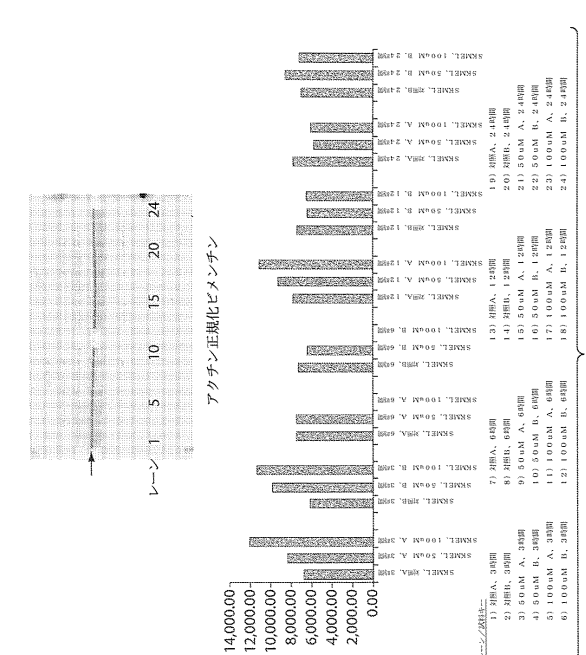
【图 1 3 B】



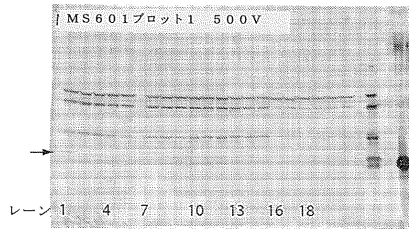
【図 14】



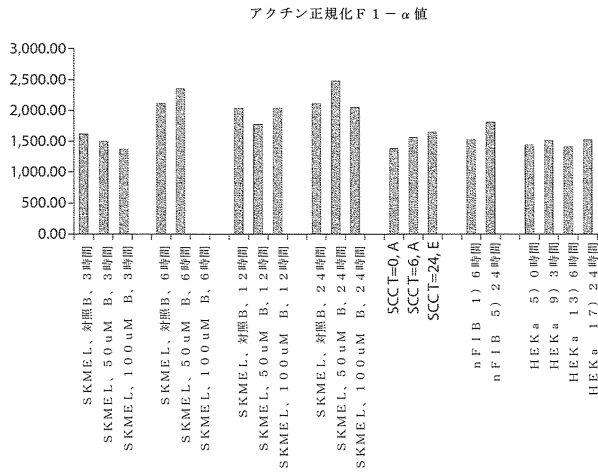
【図 15】



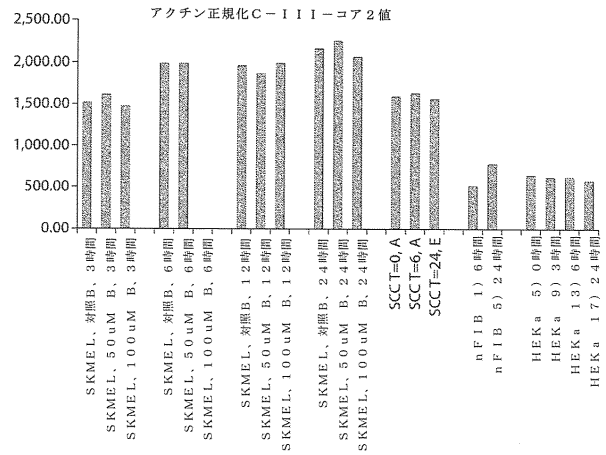
【図 16】



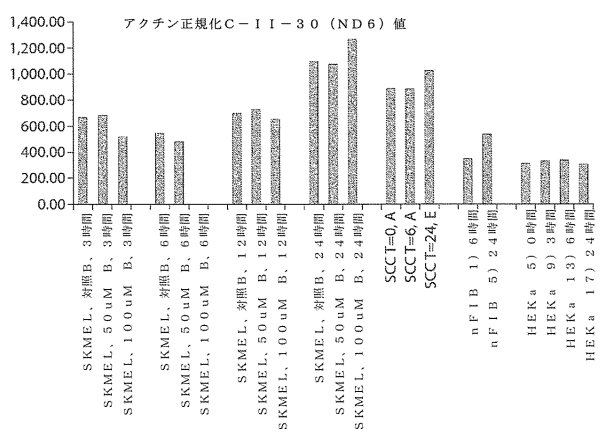
【図 17】



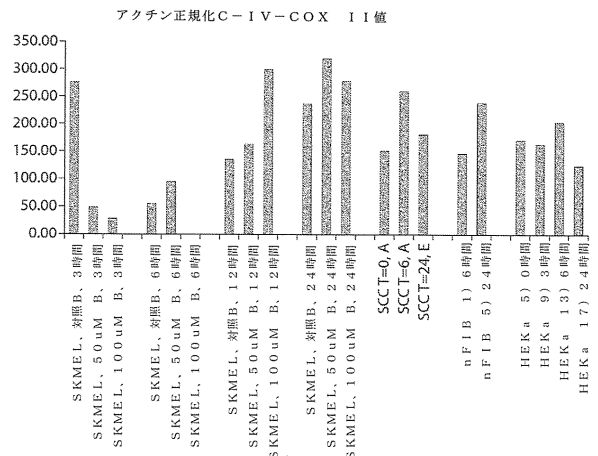
【図 18】



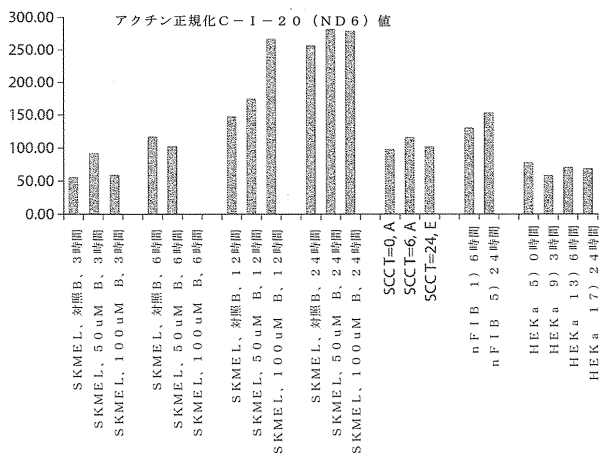
【図 19】



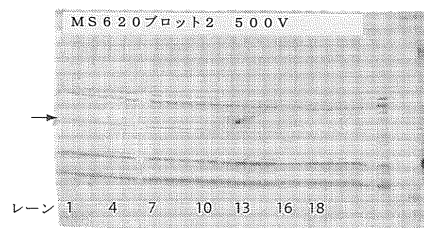
【図 20】



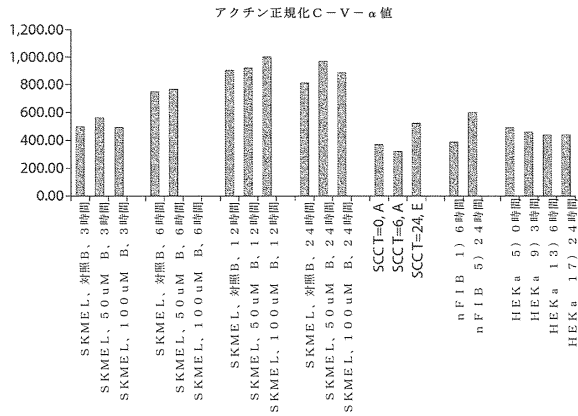
【図 21】



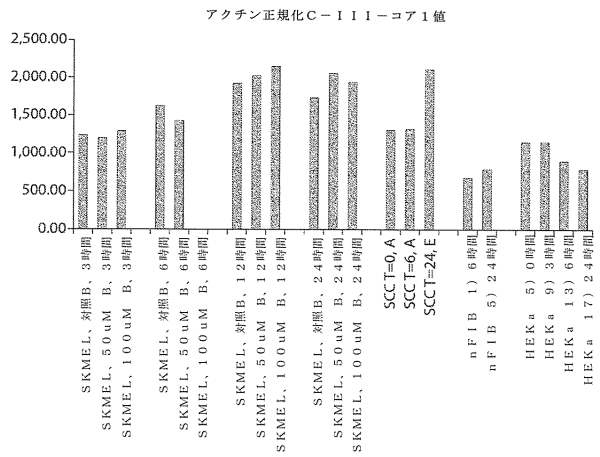
【図 22】



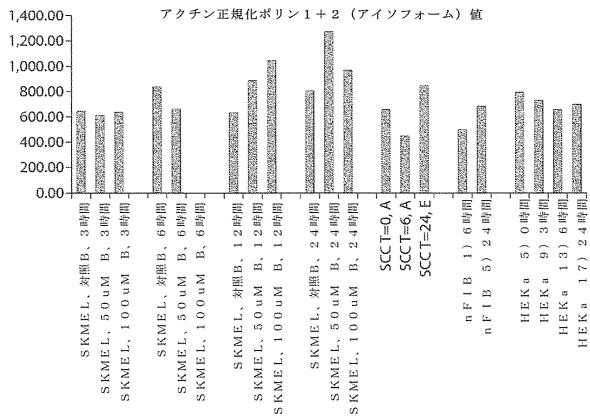
【図 2 3】



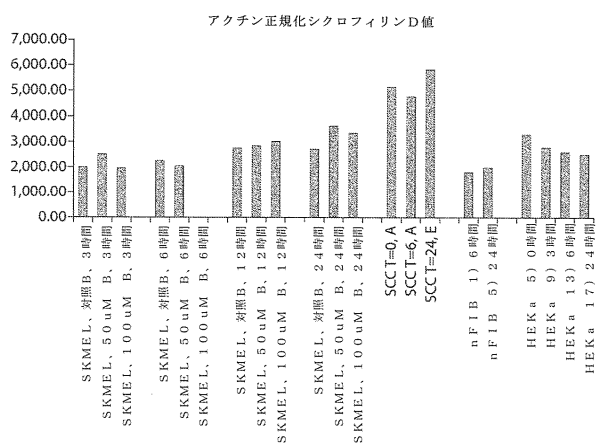
【図 2 4】



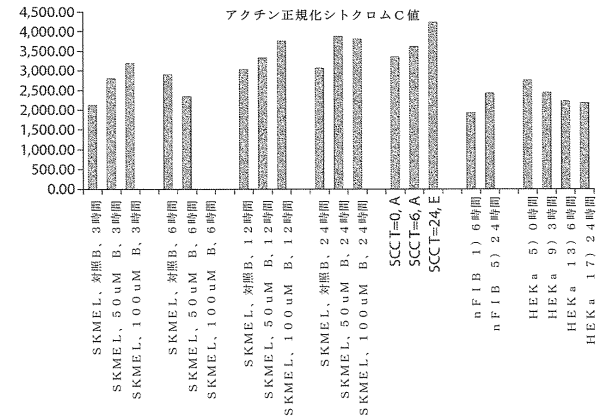
【図 2 5】



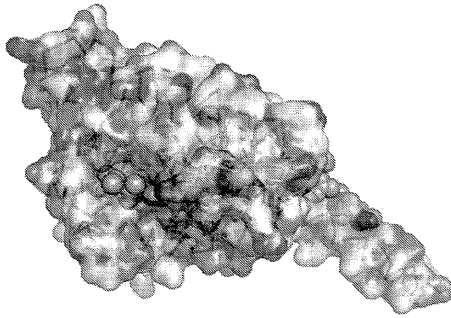
【図 2 6】



【図 2 7】

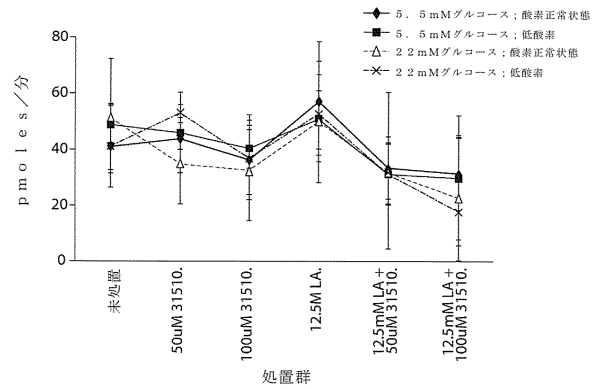


【図 28】



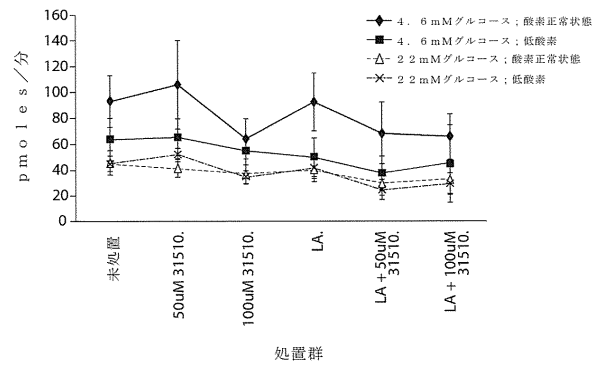
【図 29】

HDF a - OCR 比較



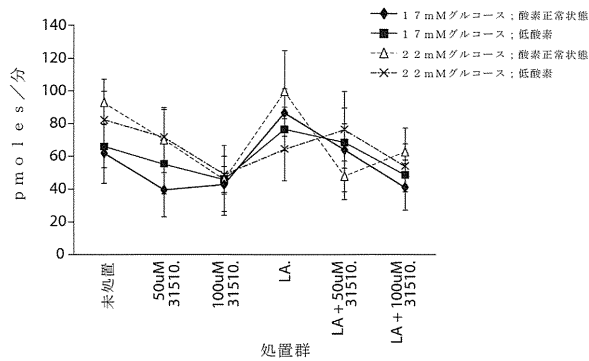
【図 30】

HASMC - OCR 比較



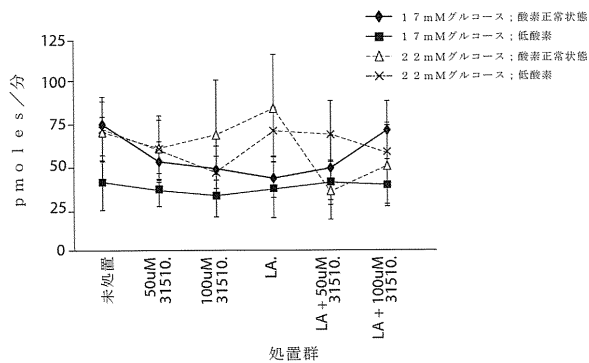
【図 31】

MCF-7 - OCR 比較



【図 32】

PaCa2 - OCR 比較



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/177,244
(32)優先日 平成21年5月11日(2009.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/177,245
(32)優先日 平成21年5月11日(2009.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/177,246
(32)優先日 平成21年5月11日(2009.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (72)発明者 ナライン, ナイヴン, ラジン
アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, スイート 2005, サード
ストリート 350
(72)発明者 マック, ジョン, パトリック
アメリカ合衆国 75034 テキサス州, フリスコ, サザン ヒルズ ドライブ 4913
(72)発明者 サランガラハン, ランガプラサド
アメリカ合衆国 01543 マサチューセッツ州, ラットランド, ウィニフレズ ウェイ 2
1

審査官 松岡 徹

- (56)参考文献 国際公開第2006/017494 (WO, A1)
国際公開第2007/095186 (WO, A1)
米国特許出願公開第2008/0038736 (US, A1)
特表2011-516568 (JP, A)
Garrel et al, Clin Cancer Res, 2006年 4月15日, Vol. 12, No. 8, p. 2498-2505
Rydberg et al, Immunology, 2009年, Vol. 128, p. e600-e611
Li et al, Hepatology Research, 2008年, Vol. 38, p. 85-95
Daniel et al, Antioxidants & Redox Signaling, 2000年, Vol. 2, No. 2, p. 263-275
Gogvadze et al, Apoptosis, 2009年 2月10日, Vol. 14, p. 624-640
Todaro et al, Cell Death and Differentiation, 2008年 1月18日, Vol. 15, p. 762-772
Okumura et al, Identification of biomarkers in ductal carcinoma in situ of the breast with microinvasion, BMC Cancer, 2008年10月 6日, Vol. 8, No. 287
Langer et al, Clin Cancer Res, 2008年12月15日, Vol. 14, No. 24, p. 8279-8287

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q
A61K
PubMed