

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-514966
(P2015-514966A)

(43) 公表日 平成27年5月21日(2015.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 ZNAD	2G045
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 107	4B024
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4B050
A61P 3/00 (2006.01)	A61P 3/00	4B063
A61P 3/04 (2006.01)	A61P 3/04	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-557806 (P2014-557806)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月15日 (2013.2.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月19日 (2014.9.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/026311
 (87) 国際公開番号 W02013/123305
 (87) 国際公開日 平成25年8月22日 (2013.8.22)
 (31) 優先権主張番号 61/599,496
 (32) 優先日 平成24年2月16日 (2012.2.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

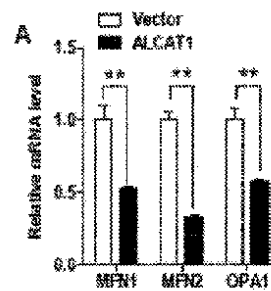
(71) 出願人 501139858
 ザ ペン ステイト リサーチ ファンデーション
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16802,
 ユニバーシティ パーク, オールド
 メイン 304
 (74) 代理人 100086461
 弁理士 齋藤 和則
 (72) 発明者 シー、ユーアン
 アメリカ合衆国、17033 ペンシルベ
 ニア州、ハーシー、ホートホーム ドライ
 ブ 87
 Fターム(参考) 2G045 CB01 DA14 DA20 DA36 DA54
 FA02 FA03
 4B024 AA11 CA04 CA12 HA14
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) の調節薬およびその使用方法

(57) 【要約】

アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤の組成物が提供される。特にアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) 阻害薬は代謝性疾患、心臓疾患、およびミトコンドリア機能不全に伴う一般的疾患を処置するのに有用である。新規のアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) 調節剤の同定のための検定法が提供される。

【選択図】 図3 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：

生体試料を試験薬と接触させるステップと、

前記生体試料内のマイトフュージン分子の発現、機能または活性を測定するステップと、

それによりアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと、

を有することを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

ある試験薬がマイトフュージン分子の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増加させる場合、当該試験薬がアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の阻害薬として同定される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性が、正常なベースライン対照と比較して実質的に減少する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記マイトフュージンが MFN2 である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記生体試料は：体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

MFN2 の発現、機能または活性を測定するための検定法は：免疫検定法、バイオチップ検定法、生物検定法、バイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィ、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：

生体試料を試験薬と接触させるステップと、

(a) 脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、 α -ミオシン重鎖 (α -MHC)、心房性ナトリウム利尿因子 (ANF)、または骨格筋アルファアクチン 1 (ACTA1) からなる心筋症を示す肥大性マーカーの発現；

(b) PTEN 誘導推定キナーゼ 1 (PINK1) の発現、機能または活性；

を測定するステップと、

40

それによりアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと；

を有することを特徴とする方法。

【請求項 8】

ある試験薬が心筋症を示す肥大性マーカーの発現をベースライン対照と比較して減少させる場合、当該試験薬がアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の阻害薬として同定される、ことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ある試験薬が PTEN 誘導推定キナーゼ 1 (PINK1) の発現、機能または活性をベ

50

ースライン対照と比較して増加させる場合、当該試験薬がアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) の発現、機能または活性の阻害薬として同定される、ことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) の発現、機能または活性が、正常なベースライン対照と比較して実質的に減少する、ことを特徴とする請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

心筋症を示す肥大性マーカーの発現を測定するための検定法は：免疫検定法、生物検定法、バイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィー、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記生体試料は：体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせからなる、ことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

ミトコンドリア機能不全を生体外または生体内で防止または処置する方法であって、細胞または患者に治療的に有効な量の、リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素の発現、機能、活性またはそれらの組み合わせを調節する薬剤を投与するステップと；

20

それによりミトコンドリア機能不全を生体外または生体内で防止または処置するステップと；

を有することを特徴とする方法。

【請求項 14】

前記リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素がアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) である、ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) は、ミトコンドリア性ポリヌクレオチド、ミトコンドリア性ポリペプチド、ミトコンドリア性タンパク質、m t D N A コピー数、ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリア融合および m t D N A 変異率、を調整する、ことを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

ミトコンドリア性タンパク質は、マイトフュージン、マイトフュージン - 1 (M F N 1)、マイトフュージン - 2 (M F N 2)、プロヒピチン、ペプチド、フラグメント、バリエーション、変異体またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

マイトフュージンは場合により、請求項 1 または請求項 7 の方法により同定された 1 つ以上のアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) 阻害薬を投与される、ことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) 阻害薬がマイトフュージン - 2 (M F N 2) の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増大させる、ことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (A L C A T 1) 阻害薬が活性酸素種 (R O S) により測定されるように、通常のベースライン対照と比較して

50

酸化ストレスを減少させる、ことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬がカルジオリピン (CL) の構造、機能、活性、発現またはそれらの組み合わせを調節する、ことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬がミトコンドリア機能不全に伴う疾病または異常を阻止または処置する、ことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ミトコンドリア機能不全に伴う疾病または異常は、糖尿病、肥満、心臓疾患または障害、勃起不全、閉経、神経変性性疾患または障害、代謝性疾患または障害を含む、ことを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ミトコンドリア機能不全を生体外および生体内で防止または処置する方法であって、細胞または患者に治療的に有効な量の、マイトフュージン分子を投与するステップと；
それによりミトコンドリア機能不全を生体外または生体内で防止または処置するステップと；
を有することを特徴とする方法。

【請求項 24】

前記マイトフュージン分子は、マイトフュージン - 1 (MFN1)、マイトフュージン - 2 (MFN2)、フラグメント、バリエント、変異体またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の阻害薬が場合によって細胞または患者に投与される、ことを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の阻害薬が請求項 1 または 7 の方法により同定される、ことを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬がマイトフュージン - 2 (MFN2) の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増大させる、ことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬が活性酸素種 (ROS) により測定されるように、通常ベースライン対照と比較して酸化ストレスを減少させる、ことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬がカルジオリピン (CL) の構造、機能、活性、発現またはそれらの組み合わせを調節する、ことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

心筋症を罹患したまたは心筋症を発症するリスクのある患者を処置する方法であって、それを必要とする患者に治療的に有効な量のアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の阻害薬を投与するステップと、それにより心筋症を罹患する患者を処置するステップと、
を有することを特徴とする方法。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の阻害薬が請求項 1 または 7 の方法により同定される、ことを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

P TEN 誘導推定キナーゼ 1 (PINK1) の調節剤が場合によって患者に投与される、ことを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

請求項 1 または 7 の方法により同定される前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬。

【請求項 34】

請求項 1 または 7 の方法により同定される前記アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 阻害薬を含む医薬組成物。

【請求項 35】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：

生体試料を試験薬と接触させるステップと、

前記生体試料内の ALCAT1 分子の発現、機能または活性を測定するステップと、

それによりアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと、

を有することを特徴とする方法。

【請求項 36】

ある試験薬がアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 分子の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増加させる場合、当該試験薬がアシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の阻害薬として同定される、ことを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性が、正常なベースライン対照と比較して実質的に減少する、ことを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) 分子は、核酸、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、遺伝子、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、バリエーション、フラグメント、変異体、またはそれらの組み合わせ、を含むことを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記生体試料は、体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

【請求項 40】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性を測定するための検定法は：免疫検定法、生物検定法、バイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィー、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

【請求項 41】

アシル補酵素 A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：

生体試料を試験薬と接触させるステップと、

糖尿病性腎症を示唆する、FAS、TNF、TGFB-、DGAT1、CHREBP1 ま

10

20

30

40

50

たは SREBP1 からなる核酸マーカーまたはそれらの符号化産物の発現、を測定するステップと、

それによりアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと、
を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 2】

ある試験薬が FAS、TNF、TGF- β 、DGAT1、および SREBP1 の発現をベースライン対照と比較して調節する場合、当該試験薬が ALCAT1 発現、機能または活性の阻害薬として同定される、ことを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

糖尿病性腎症を示唆するマーカーの発現を測定するための検定法は：免疫検定法、生物検定法、バイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィー、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記生体試料は、体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：

生体試料を試験薬と接触させるステップと、
脂肪肝を示唆する、PPAR α 、Srebp1c、FAS、ACC1、DGAT1、または CPT1 からなる核酸マーカーまたはそれらの符号化産物の発現、を測定するステップと、

それによりアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと、
を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

ある試験薬が PPAR α 、Srebp1c、FAS、ACC1、DGAT1、または CPT1 の発現をベースライン対照と比較して調節する場合、当該試験薬がアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の阻害薬として同定される、ことを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性が、正常なベースライン対照と比較して実質的に減少する、ことを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

脂肪肝を示唆するマーカーの発現を測定するための検定法は：免疫検定法、生物検定法、バイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィー、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記生体試料は、体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 1 または 4 5 に記載の方法により同定されるアシル補酵素 A : リゾカルジオリ

10

20

30

40

50

ピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤。

【請求項 5 1】

請求項 4 1 または 4 5 の方法により同定される前記アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の阻害薬を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミトコンドリア機能不全、代謝性疾患、神経性疾患および心臓病にともなう疾病の治療のための組成物に関するものである。またその新規の薬物の識別方法および治療における使用方法が提供される。

10

【0002】

本発明は許可番号 DK076685 により国立保健局により与えられた米国政府援助を受けて作られている。米国政府は本発明に一定の権利を有することがある。

【0003】

本発明は 2012 年 2 月 16 出願の米国暫定出願 61/599,496、タイトル「アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節薬およびその使用方法」に対し優先権を主張し、それはここに参照としてその全てが採り入れられる。

【背景技術】

20

【0004】

カルジオリピン (CL)、ミトコンドリア・リン脂質は最初に心臓で同定され、正常な心臓機能の維持において中心的役割を果たしている。哺乳類では、カルジオリピン (CL) の生物学的機能は脂肪酸アシル鎖の構成により決定され、それは心臓、肝臓、および骨格筋のような代謝組織ではリノール酸が支配的である (18:2)。このユニークなアシル構成はミトコンドリア膜のプロトン勾配および種々のミトコンドリア酵素およびタンパク質の活性をサポートしていると信じられている。従って健全な哺乳類の心臓において支配的な種であるテトラリノイルカルジオリピン (TLCL) の減少は、拡張型心筋症の齧歯動物およびヒトの両方において、心臓疾患の発症中に起こる。カルジオリピン (CL) はホスファチジン酸から一連のステップで生合成される。新しく合成されたカルジオリピン (CL) はその脂肪酸アシル鎖にリノール酸を組み込むためにホスホリパーゼおよびアシル基転移酵素の絡んだ再構築プロセスを経なければならない。従って欠陥のあるカルジオリピン (CL) 再構築は、パース症候群にける拡張型心筋症、カルジオリピン (CL) におけるリノール酸欠陥より特徴づけられる X 染色体異常、ミトコンドリア機能不全、発育不全および好中球減少症の原因となる。さらに病理学的 CL 再構築からの異所カルジオリピン (CL) アシル構造は、糖尿病、肥満、循環器疾患、および神経変性、これらすべてはミトコンドリア機能不全、カルジオリピン (CL) 欠乏症、カルジオリピン (CL) におけるドコサヘキサエン酸 (DHA) の高濃度化、およびミトコンドリア機能不全を特徴とするが、を含む加齢や加齢関連疾病にある病態生理学的な状態のホストに関連付けられてきた。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】米国暫定特許出願 61/599,496

【発明の概要】

【0006】

本概要は本発明の性格と要点を簡潔に示すための発明の概要を示すために提供された。本概要は本発明の請求の範囲または意味を解釈または制限するものではないことを理解されたい。

本発明の実施形態は、なかんずく、リゾカルジオリピン、詳細にはアシル補酵素 A : リ

50

ゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能および/または活性を調節する組成物に向けられている。詳細にはALCAT1の阻害薬は代謝性疾患、心臓疾患、ミトコンドリア機能不全に伴う一般的な疾病の治療に有用である。新規のALCAT1調節薬の同定のための検定法が提供される。

【0007】

ある実施形態ではアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：生体試料を試験薬と接触させるステップと、生体試料内のマイトフュージン分子の発現、機能または活性を測定するステップと、それによりアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと、を有することを特徴とする方法が提供される。ある実施形態ではある試験薬がマイトフュージン分子の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増加させる場合、当該試験薬がALCAT1発現、機能または活性の阻害薬として同定される。好適にはALCAT1の発現、機能または活性が、正常なベースライン対照と比較して実質的に減少する。

10

【0008】

他の実施形態ではMFN2の発現、機能または活性を測定するための検定法は：免疫検定法、生物検定法、バイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィー、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む。

20

【0009】

もう1つの実施形態では、アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：生体試料を試験薬と接触させるステップと、(a) 脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、 α -ミオシン重鎖 (α -MHC)、心房性ナトリウム利尿因子 (ANF)、または骨格筋アルファアクチン 1 (ACTA1) からなる心筋症を示す肥大性マーカーの発現；(b) PTEN誘導推定キナーゼ 1 (PINK1) の発現、機能または活性；を測定するステップと、それによりアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の調節剤を同定するステップと；を有することを特徴とする方法が提供される。

【0010】

ある実施形態では、ある試験薬が心筋症を示す肥大性マーカーの発現をベースライン対照と比較して減少させる場合、当該試験薬がALCAT1発現、機能または活性の阻害薬として同定される。ある側面では、ある試験薬がPTEN誘導推定キナーゼ 1 (PINK1) の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増加させる場合、当該試験薬がALCAT1発現、機能または活性の阻害薬として同定される。

30

【0011】

他の好適な実施形態では、ミトコンドリア機能不全を生体外または生体内で防止または処置する方法であって、細胞または患者に治療的に有効な量の、リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素の発現、機能、活性またはそれらの組み合わせを調節する薬剤を投与するステップと；それによりミトコンドリア機能不全を生体外または生体内で防止または処置するステップと；を有することを特徴とする方法が提供される。ある実施形態ではリゾカルジオリピン・アシル基転移酵素がアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) である。

40

【0012】

他の実施形態では、アシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) は、ミトコンドリア性ポリヌクレオチド、ミトコンドリア性ポリペプチド、ミトコンドリア性タンパク質、mtDNAコピー数、ミトコンドリアの質量、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリア融合およびmtDNA変異率、を調整する。

【0013】

他の好適な実施形態では、ミトコンドリア性タンパク質は、マイトフュージン、マイトフュージン - 1 (MFN1)、マイトフュージン - 2 (MFN2)、プロヒピチン、ペプ

50

チド、フラグメント、バリエーション、変異体またはそれらの組み合わせを含む。

【0014】

もう一つの実施形態では、マイトフュージンは場合により、同定されないALCAT1阻害薬を含む、ここに記載の任意の方法により同定される、1つ以上のALCAT1阻害薬を投与される。

【0015】

ある実施形態では、ALCAT1阻害薬がマイトフュージン-2(MFN2)の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増大させる。

【0016】

もう一つの実施形態では、ALCAT1阻害薬が活性酸素種(ROS)により測定されるように、通常のベースライン対照と比較して酸化ストレスを減少させる。

10

【0017】

他の実施形態では、ALCAT1阻害薬がカルジオリピン(CL)の構造、機能、活性、発現またはそれらの組み合わせを調節する。

【0018】

ある実施形態では、ALCAT1阻害薬がミトコンドリア機能不全に伴う疾病または異常を阻止または処置する。事例は制限しないが、糖尿病、肥満、心臓疾患または異常、勃起不全、閉経、神経変性性疾患または障害、代謝性疾患または障害を含む。

【0019】

他の好適な実施形態では、ミトコンドリア機能不全を生体外および生体内で防止または処置する方法であって、細胞または患者に治療的に有効な量の、マイトフュージン分子を投与するステップと； それによりミトコンドリア機能不全を生体外または生体内で防止または処置するステップと； を有することを特徴とする方法。

20

【0020】

もう一つの良い実施形態では、心筋症を罹患したまたは心筋症を発症するリスクのある患者を処置する方法であって、それを必要とする患者に治療的に有効な量のアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1(ALCAT1)の阻害薬を投与するステップと、それにより心筋症を罹患する患者を処置するステップと、を有することを特徴とする方法が提供される。

【0021】

他の好適な実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1(ALCAT1)の阻害薬がここに記載の任意の方法により同定される。

30

【0022】

他の実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1(ALCAT1)阻害薬を含む医薬組成物がここに記載の任意の方法により同定される。

【0023】

他の好適な実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1(ALCAT1)の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法であって：生体試料を試験薬と接触させるステップと、生体試料内のALCAT1分子の発現、機能または活性を測定するステップと、それによりアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1(ALCAT1)の調節剤を同定するステップと、を有することを特徴とする方法が提供される。好適には、ある試験薬がALCAT1分子の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増加させる場合、当該試験薬がALCAT1発現、機能または活性の阻害薬として同定される。

40

【0024】

ある実施形態では、ALCAT1分子は、核酸、オリゴヌクレオチド、遺伝子、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、バリエーション、フラグメント、変異体、またはそれらの組み合わせ、を含む。

【0025】

ある実施形態では、生体試料は、体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド

50

、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせを含む。

【0026】

他の実施形態では、任意の分子の発現、機能または活性を測定するための検定法は：免疫検定法、生物検定法、パイオチップ検定法、プロット検定法、ハイブリダイゼーション検定法、細胞ベース検定法、ハイスループットスクリーニング検定法、クロマトグラフィー、化学検定法、ファージディスプレイ検定法、またはそれらの組み合わせを含む。

【0027】

他の側面は以下に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A - 1I】ALCAT1がC2C12細胞の中でミトコンドリアの断片化とミトコンドリアDNA (mtDNA) の不安定性を引き起こすことを示す図である。図1A, 1B: C2C12細胞中のミトコンドリアネットワークの共焦点顕微鏡分析がMitoTracker Redにより安定的にALCAT1 (図1B) またはベクター対照 (図1A) を発現することを示す。挿入図は囲み部分の拡大図である。スケールバーは5ミクロンを示す。図1C: ALCAT1またはベクター対照を発現するC2C12細胞中のミトコンドリアの形態の定量分析を3つのカテゴリーで行った図である: 「チューブ状」; 90%超が細長い相互接続されたネットワーク、「混合」; チューブ状のミトコンドリアと短いミトコンドリアの混合、「フラグメント」; 90%超が短い点状ミトコンドリア。独立した3つの実験からのデータであり、N = 300。図1D - 1G: C2C12細胞中のミトコンドリア形態の電子顕微鏡分析が安定的にALCAT1 (図1E, 図1Gは拡大図) またはベクター対照 (図1D, 図1Fは拡大図) を発現することを示す。スケールバーは1ミクロンを示す。図1H - 1I: 安定的にALCAT1を発現するC2C12細胞、またはベクター対照中のmtDNAのコピー数 (図1H) と点変異率 (図1I) の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析を示す。* p < 0.05、** p < 0.01、N = 3。

10

20

【0029】

【図2A - 2H】ALCAT1欠乏がミトコンドリアの質を有意に増大させ、そしてmtDNAのフィデリティを改善することを示す図である。図2A - 2D: 野生型の対照マウス (WT) から (図2A、拡大図2C) と、ALCAT1ノックアウトマウス (KO) から (図2B、拡大図2D) の、マウス胚性線維芽細胞 (MEF細胞) におけるミトコンドリア形態の電子顕微鏡分析である。図2E - 2F: 野生型の対照マウス (WT) から (図2E) と、ALCAT1ノックアウトマウス (KO) から (図2F) の、前脛骨筋の縦断面の電子顕微鏡分析の図である。矢印はそれぞれAバンド、Iバンド、Zラインおよびミトコンドリア (M) を示す。図2G - 2H: 野生型の対照マウス (WT) からと、ALCAT1ノックアウトマウス (KO) と、から単離されたMEF細胞におけるmtDNAのコピー数 (図2G) および点変異率 (図2H) を示す図である。** < 0.01、N = 3。

30

【0030】

【図3A - 3E】ALCAT1がマイトフュージン1 (MFN1) とマイトフュージン2 (MFN2) の生合成を調節することを示す図である。図3A - 3B: ALCAT1を安定的に発現するC1C12細胞 (図3A) またはベクター対照における、およびWTおよびKOマウスから単離されたマウス胚性線維芽細胞 (MEF) における (図3B)、MFN1, MFN2 およびOPA1のmRNA発現レベルのリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 分析の図である。グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 発現が内部対照として使用された。図3C: ALCAT1発現するC1C12細胞またはベクター対照内のMFN1, MFN2 およびOPA1のタンパク質レベルのウェスタンブロット分析である。アクチンをタンパク質負荷用の内部対照として使用した各バンドの相対密度が各レーンの下に表示されている。図3D: アクチンをタンパク質負荷用の内部対照として使用した、WTおよびKOマウスから単離されたマウス胚性線維芽細胞

40

50

(MEF)内のMFN1, MFN2、OPA1、カルネキシンおよびプロヒピチンのタンパク質レベルのウェスタンブロット分析である。各グループN = 3 胎児マウス。 図3E : パネルEに示されたデータの定量分析。対照と比較した場合 * p < 0.05、** p < 0.01。

【0031】

【図4A - 4L】C2C12細胞においてALCAT1がミトコンドリア融合を損ない、それはMFN2発現により防護されることを示す図である。安定してALCAT1を発現するC2C12細胞またはベクター対照が一時的にミトコンドリア標的緑色蛍光タンパク質(GFP)またはDsRed(mtRFP:ミトコンドリア標的赤色蛍光タンパク質)に対する発現プラスミドを形質移入され、共にプレートに乗せられ、そしてPEG-1500と融合され、その後共焦点顕微鏡画像を撮影された。 図4A - 4D : 安定してベクター対照を発現するC2C12細胞内のミトコンドリアの共焦点画像であり、それは図4Cの黄色部分とそれが拡大された図4Dにより証明されるように、完全な融合を示す。 図4E - 4H : 安定してALCAT1を発現するC2C12細胞内のミトコンドリアの共焦点画像であり、それは図4Gの離れた赤色と緑色部分とそれが拡大された図4Eにより証明されるように、融合不全を示す。 図4I - 4L : MNF2(MFN2-YFP)の一過性発現が、安定してALCAT1を発現するC2C12細胞内の融合不全を救済したことを示す(図4K、図4Lは拡大図)図である。スケールバーは5ミクロンを示す。

10

【0032】

【図5A - 5J】C2C12 A1細胞において、MFN1とMFN2の過剰発現がミトコンドリアのネットワークを回復する、ただしOPA1はそうではない、ことを示す図である。 図5A - 5D : ベクター対照(図5A - 5B)またはALCAT1(図5C - 5D)を安定して発現するC1C12細胞内のミトコンドリアネットワークの共焦点画像分析である。安定なC1C12細胞系が一時的にミトコンドリア標的EGFP発現ベクターを形質移入され(図5A, 5C)、そしてミトトラッカーレッドで染色され(図5B, 5D)、その後画像化された。 図5E - 5J : 安定してALCAT1を発現し、そして一時的にMyc-タグ付きMFN1(図5E - 5F)、MFN2-YFP(黄色蛍光タンパク質)(図5G - 5H)またはMyc-タグ付きOPA1(図5I - 5J)に対する発現ベクターをそれぞれ形質移入されたC1C12細胞内のミトコンドリアネットワークの共焦点画像分析である。Myc-タグ付きタンパク質に対しては、細胞は抗Myc抗体で、次にヤギ抗マウスFITC接合抗体(緑色)で、その後ミトトラッカーレッドで免疫染色された。スケールバーは5ミクロンを示す。

20

30

【0033】

【図6A - 6D】安定してALCAT1を発現するC1C12細胞において、MFN2がミトコンドリア呼吸能力を回復することを示す図である。安定してALCAT1を発現するC1C12細胞がMFN2またはEGFPに対する発現ベクターを一時的に形質移入され、そして種々のミトコンドリア阻害薬での処置に应答した酸素消費速度(OCR)に関してベクター対照と比較された。 図6A : 阻害薬が FCCP、ミトコンドリア脱共役剤 図6B : 阻害薬がロテノン、呼吸鎖複合体I阻害薬 図6C : 阻害薬がアンチマイシン、呼吸鎖複合体III阻害薬 図6D : 阻害薬がオリゴマイシン、ATPアーゼ阻害薬 外因性および内因性のMFN2タンパク質レベルが、ウェスタンブロット分析法により、図6Aに示すMFN2抗体を使用して分析された。OCRは Seahorse X-24 分析器を使用して分析され、それぞれの化学処理に対して少なくとも3回の独立した測定から計算された。* p < 0.05 (対照に比べて) ; # p < 0.05そして## p < 0.01 (形質移入されていないALCAT1を発現する細胞に比べて)。

40

【0034】

【図7A - 7H】ALCAT1による酸化ストレスが活性酸素種(ROS)生成をMNF2欠乏にリンクさせることを示す図である。 図7A - 7D : 1mMのH₂O₂で処置した野生型(WT)マウス(図7A、拡大図7C)またはノックアウト(KO)マウス(図7B、拡大図7D)からのマウス胚性線維芽細胞(MEF)におけるミトコンドリア形態

50

の電子顕微鏡分析である。 図7E：ALCAT1またはベクター対照を安定して発現するC1C12細胞が図に示すH₂O₂投与量で処置され、その後、酸化ストレスからの脂質過酸化物であるマロンジアルデヒド(MDA)のレベルを分析した。 ** p < 0.01ベクター対照との比較。 図7F：ALCAT1またはベクター対照を安定して発現するC1C12細胞が図7Eに示す増加するH₂O₂投与量で処置され、その後 - アクチンをタンパク質負荷に対する対照として使用してMFN1とMFN2に対するウェスタンブロット分析が行われた。 図7G：ALCAT1またはベクター対照を安定して発現するC1C12細胞のMFN1とMFN2発現に対するウェスタンブロット分析であるが、1.5 mMのH₂O₂処置の前に種々の用量(0.1 Mと5 M)の、NADPHオキシダーゼ阻害薬である、ジフェニルヨードニウム(DPI)により事前に処置されている。 図7H：酸化ストレスをMFN2欠乏およびミトコンドリア分裂にリンクさせる原因となる、ALCAT1の役割を示す概略モデルである。

10

【0035】

【図8】ALCAT1を安定して発現するC1C12細胞におけるALCAT1のmRNA発現レベルのRT-PCR分析を示す図である。ALCAT1発現ベクターまたは空ベクターを安定的に形質移入されたC1C12細胞が個々のクローンに対し選択された。ALCAT1またはベクター対照を安定して発現するC1C12細胞系がALCAT1のmRNA発現に対しRT-PCR分析法により分析された。

【0036】

【図9A-9D】MEFにおいて、ALCAT1欠乏が酸化ストレスにตอบสนองしてミトコンドリア分裂を阻害することを示す図である。ALCAT1ノックアウト(KO)マウス(図9B, 9D)および野生型(WT)対照マウス(図9A, 9C)が0.5 mMのH₂O₂のない場合(図9A, 9B)とある場合(図9C, 9D)において2時間培養され、その後ミトコンドリアネットワークがMitotracker Redでの染色により分析された。ベクター対照と対照的に、ALCAT1欠乏が酸化ストレスにตอบสนองしてミトコンドリア分裂を阻害した。

20

【0037】

【図10】C1C12細胞におけるALCAT1過剰発現がミトコンドリア膨化を引き起こすことを示す図である。ALCAT1発現ベクターまたは空ベクターを安定的に形質移入されたC1C12細胞が個々のクローンに対し選択された。ALCAT1またはベクター対照を安定して発現するC1C12細胞系がミトコンドリア形態について電子顕微鏡により分析された。ALCAT1過剰発現が激しいミトコンドリア膨化を引き起こした、それは拡大したミトコンドリアと損傷されたクリステにより証明された。

30

【0038】

【図11A-11F】ALCAT1が心筋症において酸化ストレスおよび脂質過酸化を調節することを示す図である。ALCAT1を安定的に過剰発現するH9c2細胞又はベクター対照が分析された。図11A：リン酸緩衝食塩水(PBS)、またはPBSに2 mMのH₂O₂を加えたものによる2時間処置にตอบสนองした、脂質過酸化の副産物であるチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)の細胞内レベルを示す。図11B：単離されたミトコンドリアからのH₂O₂のリアルタイム生成を示す。図11C：図示されるH₂O₂の用量で処置後のmtDNAコピー数を示す。平均値 ± SEM (n = 3)。図11D：溶媒またはT4で連続28日処置された野生型(WT)とALCAT1ノックアウトマウス(KO)からの単離心室におけるチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)レベルが分析された。平均値 ± SEM (n = 5)。図11E-11F：安定的にベクター対照を発現する(図11E)またはALCAT1を発現する(図11F)H9c2細胞の心筋細胞への分化を示す。

40

【0039】

【図12A-12E】ALCAT1の標的不活化は甲状腺機能亢進性心筋症を防止することを示す図である。野生型(WT)およびノックアウト(KO)マウスが溶媒またはT4で28日間処置され、そして分析された。12A：H&E染色による心臓全体の断面の形

50

態を示す。12B：心臓重量対体重比を示す。12C - 12E：心室中隔欠損症（IVSD）、左室拡張末期径（LVEDD）および左室後壁寸法（LVPRWD）を含む心エコー検査パラメータを示す。n = 6 - 8、*P < 0.05、**P < 0.01。

【0040】

【図13A - 13G】ALCAT1の消失は、T4誘発の心筋細胞の肥大生長を緩和することを示す図である。13A - 13D：野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスが溶媒またはT4で28日間処置され、そしてH&E染色による心筋細胞の形態が分析された。図13E - 13F：心筋細胞の大きさ及び直径の平均値の定量分析である。n = 250。**P < 0.01。図13G：野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスをT4で28日間処置後の心筋細胞の大きさの分布分析である。n = 250。

10

【0041】

【図14A - 14F】ALCAT1欠乏がT4誘発心室線維症の発症を防止することを示す図である。野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスが溶媒またはT4で28日間処置され、そして心室線維症が分析された。図14A - 14D：溶媒（図14A、14C）およびT4（図14B、14D）で28日間処置された野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスからのマッソン3色染色法で染色された左心室の代表的断面である。青色染色を呈する線維症領域は矢印で示されている。図14E - 14F：図14A - 14Dで使用されたものと同じサンプルからのコラーゲンIおよびコラーゲンIIIを含む線維症バイオマーカーのmRNAレベルのRT-PCR分析である。n = 5、*P < 0.05、**P < 0.01。

20

【0042】

【図15A - 15D】ALCAT1欠乏が心筋症に付随するバイオマーカーの発現を正常化することを示す図である。図15A - 15D：野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスが溶媒またはT4で28日間処置され、そして脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、 β -ミオシン重鎖（ β -MHC）、心房性ナトリウム利尿因子（ANF）、および骨格筋アルファアクチン1（ACTA1）を含む左心室肥大および心不全のバイオマーカーのmRNA出現レベルが分析された。n = 6 - 8、*P < 0.05、**P < 0.01。

【0043】

【図16A - 16G】ALCAT1不活化がT4誘発ミトコンドリア膨化およびマイトファジーを減少させることを示す図である。図16A - 16D：28日間のT4処置後の野生型（WT）（図16A、16B）およびノックアウト（KO）マウス（図16C、16D）からの心筋症の代表的顕微鏡図である。矢印は損傷した構造および異常形態を呈するミトコンドリアを示す。図16Aと16Bのボックスで囲んだ領域は図16Cと16Dで拡大され、それらはマイトファジー進行中のミトコンドリアを示す。スケールバーは1ミクロンを示す。図16E：GAPDHを内部対照として使用した個々の野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスからの単離心室組織における自己貪食バイオマーカー、LC3、p62、およびPINK1のウェスタンブロット分析である。図16F - 16G：図16Eで示されたLC3（図16F）とPINK1（図16G）タンパク質の発現レベルの定量分析である。*P < 0.05、**P < 0.01。

30

40

【0044】

【図17A - 17B】心筋細胞においてALCAT1による酸化ストレスがAkt-mTORシグナリングを調節することを示す図である。図17A - 17B：ALCAT1を安定して発現するH9c2心細胞またはベクター対照が図示の用量のインシュリン（図17A）または100nMのT3で図示の時間（図17B）刺激され、その後Akt、Erk、S6K1、および4E-BPがアクチンを内部対照として使用してウェスタンブロット法で分析された。

【図17C】野生型（WT）およびノックアウト（KO）マウスが溶媒またはT4で28日間処置され、その後心筋細胞におけるAkt、GSK3 α / β 、及び4E-BPのリン酸化がGAPDHを内部対照として使用してウェスタンブロット法で分析された。

50

【0045】

【図18A - 18B】H9c2細胞におけるALCAT1過剰発現は心筋細胞への分化において肥大生長および障害を引き起こすことを示す図である。図18A：フラッグタグ付きALCAT1を安定的に発現するH9c2細胞またはベクター対照について連続する7世代(p1 - p7)に亘って成長速度が細胞計数により分析された。図18B：ALCAT1を安定的に発現するH9c2細胞またはベクター対照が通常媒体または心筋細胞への分化を誘発する分化媒体(DM)内で培養され、その後ミオゲニンおよびALCAT1発現が抗ミオゲニンおよびフラッグ抗体を使用してウェスタンブロット分析された。グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)はタンパク質負荷に対する内部対照としてであった。

10

【0046】

【図19A - 19F】ALCAT1の欠失は心筋症に伴うミトコンドリア損傷およびマイトファジーを防止することを示す図である。野生型(WT)およびALCAT1ノックアウト(KO)マウスが溶媒またはT4で28日間処置され、電子顕微鏡画像分析が心室筋肉の長手方向切片について実施された。図19A - 19B：溶媒処置野生型(WT)(図19A)およびノックアウト(KO)(図19B)マウスからの心筋細胞の代表的顕微鏡図である。図19C - 19F：甲状腺機能亢進症が野生型(WT)マウスにおいて(図19C)ノックアウト(KO)マウス(図19E)と比較して損傷ミトコンドリアの数を著しく増加させた。図19Cと19Eのボックスで囲まれた領域は図19Dおよび19Fでそれぞれ拡大され、それはマイトファジー進行中のミトコンドリアを示す。スケールバー寸法は1ミクロン。

20

【0047】

【図20】心筋症における甲状腺ホルモンの急性処置に応答したAkt-mTOR信号伝達経路の分析を示す図である。野生型(WT)およびALCAT1ノックアウト(KO)マウスが溶媒またはT4で2日間処置され、その後Aktタンパク質、リボソームタンパク質S6キナーゼ(S6K)および哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)のリン酸化反応が、GAPDHをタンパク質負荷にたいする内部対照として使用して、ウェスタンブロット分析された。

【0048】

【図21A - 21D】ALCAT1欠失が糖尿病性腎障害を防止したことを示す図である。ALCAT1ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注入された。ストレプトゾトシン(STZ)は膵島細胞を消失させることにより1型糖尿病を引き起こす薬剤である。ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスは注入の3日後共に高血糖症を発症した。注入後12週間後、腎臓サンプルが獲得され、切片にされ、そしてヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色され糖尿病誘発腎障害が検査された。非糖尿病ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスからの腎臓は正常であった(図21A、21B)。しかしWT対照マウスは糖尿病性腎不全を発症し、それは糖尿病性腎臓皮質における管状拡張、萎縮症、および細胞質空胞化を伴う変性により実証された(図21C)。対照的に糖尿病性ALCAT1ノックアウト(KO)マウスの腎臓では、これらの生理学的変化は防止された(図21D)。

30

40

【0049】

【図22A - 22D】ALCAT1欠失が糖尿病性腎障害に伴う腎臓線維症を防止したことを示す図である。ALCAT1ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注入された。ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスは注入の3日後共に高血糖症を発症した。注入後12週間後、腎臓サンプルが獲得され、切片にされ、マッソン3色染色法で検査され、糖尿病性腎障害の主要指標である腎臓線維症のレベルの変化を分析された。図22Aおよび22Bに示すように非糖尿病ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスからの腎臓は正常な形態を示した。対照的に、野生型(WT)対照マウスにおける

50

糖尿病の発症は腎不全を引き起こし（図22C）、それはトリクロームによる強い染色（青色）により実証された。対照的に、これらの生理学的変化は糖尿病性ALCAT1ノックアウト（KO）マウスの腎臓では防止された（図22D）。

【0050】

【図23A-23F】ALCAT1欠失が糖尿病性腎障害に伴うバイオマーカーのmRNA発現を抑制したことを示す図である。ALCAT1ノックアウト（KO）マウスおよび野生型（WT）対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン（STZ）を腹腔内注入された。ノックアウト（KO）マウスおよび野生型（WT）マウスは注入の3日後共に高血糖症を発症した。注入後12週間後、腎臓サンプルは全RNAを抽出され、その後糖尿病性腎障害の指標となる、FAS（図23A）、TNF（図23B）、TGF- β （図23C）、DGAT1（図23D）、CHREBP1（図23E）およびSREBP1（図23F）を含むバイオマーカーのmRNAレベルのRT-PCR分析が行われた。糖尿病性腎障害の発症は、野生型（WT）糖尿病マウスの腎臓において、CHREBP1を除く全てのバイオマーカーのmRNA発現を増加させた。対照的に、糖尿病ALCAT1ノックアウト（KO）マウスの腎臓では、これらの生理学的変化は緩和された。n = 3 - 6、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001。この結果はALCAT1阻害薬が、糖尿病患者において腎不全の最も多い原因である糖尿病性腎障害に対する新規の治療法を提供することを実証した。

10

【0051】

【図24A-24F】ALCAT1欠失が高脂肪摂取に誘発された脂肪肝を防止したことを示す図である。ALCAT1ノックアウト（KO）マウスおよび野生型（WT）対照が肥満とそれに関係する脂肪肝疾病を誘発するため高脂肪食餌（HFD）を連続18週与えられた。食餌研究の最後にマウスは食餌誘発性肥満に伴う肝臓内の生理学的変化についてH&E染色により分析された。食餌誘発性肥満の発症にตอบสนองして野生型（WT）マウスは典型的な脂肪肝疾病を発症し、それは拡大された薄い色の肝臓により実証された（図24A）。さらに、H&E染色は野生型（WT）マウスにおいて細胞内バシレーションおよび激しい肝臓細胞内空胞形成の存在を明らかにした（図24C、拡大図24E）。対照的に、これら生理学的欠陥は高脂肪食餌（HFD）で食餌されたALCAT1ノックアウト（KO）マウスでは完全に消失した（図24A, 24D拡大図24F）。

20

【0052】

【図25A-25F】ALCAT1欠失が脂肪肝疾病に伴うバイオマーカーのmRNA発現を抑制したことを示す図である。ALCAT1ノックアウト（KO）マウスおよび野生型（WT）対照が肥満とそれに関係する脂肪肝疾病を誘発するため高脂肪食餌（HFD）を連続18週与えられた。食餌研究の最後にマウスは、PPAR α （図25A）、SREBP1c（図25B）、FAS（図25C）、ACC1（図25D）、DGAT1（図25E）、CPT1（図25F）を含む脂肪肝に伴う肝臓内の脂質生成遺伝子のmRNA発現の変化について分析された。脂肪肝の発症は野生型（WT）対照マウスにおいてPPAR α , SREBP1c, FAS, ACC1, およびCPT1のmRNA発現を有意に増加させた。対照的に、ALCAT1ノックアウト（KO）マウスの肝臓では、これらの生理学的変化は完全に緩和された。n = 3 - 6、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001。この結果はALCAT1阻害薬が、肥満と2型糖尿病の最も多い原因である脂肪肝に対する新規の治療法を提供することを実証した。

30

40

【0053】

【図26A-26D】ALCAT1ノックアウト（KO）マウスが糖尿病誘発心臓委縮症から保護されることを示す図である。ALCAT1ノックアウト（KO）マウスおよび野生型（WT）対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン（STZ）を腹腔内注入された。ノックアウト（KO）マウスおよび野生型（WT）マウスは注入の3日後共に高血糖症を発症した。注入後12週間後、マウスは心臓委縮症および形態についてH&E染色により分析された。1型糖尿病の発症は、心臓重量（図26C）および心臓重量/体重比率（図26D）の有意の減少により実証されたように、野生型（WT）対照において激

50

しい心臓拡大および委縮を引き起こし(図26A)た。対照的に正常な心臓形態(図26B)および心臓重量(図26C, 26D)を示したALCAT1ノックアウト(KO)糖尿病マウスでは、これらの生理学的変化は緩和された。n = 3 - 6、* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001。

【0054】

【図27A - 27D】ALCAT1欠失が糖尿病性心臓線維症の発症を防止することを示す図である。ALCAT1ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注入された。ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスは注入の3日後共に高血糖症を発症した。注入後12週間後、心臓サンプルが切片にされ、マッソン3色染色法で検査され、糖尿病性心不全の主要指標である心臓線維症に対するALCAT1欠乏の影響が分析された。非糖尿病ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスからの心臓は非糖尿病条件下では正常な構造を示した(図27A, 27B)。しかし、野生型(WT)対照マウスにおける糖尿病の発症は激しい心臓線維症を引き起こし(図27C)、それは強い染色(青色)により実証された。対照的に、ALCAT1欠乏は糖尿病性ALCAT1ノックアウト(KO)マウスの心臓組織において高血糖症誘発コラーゲン線維の蓄積を引き起こした(図27D)。この結果はALCAT1阻害薬が、糖尿病患者における最も多い死因である糖尿病性心不全に対する新規の治療法を提供することを実証した。

10

【0055】

【図28A - 28F】ALCAT1ノックアウト(KO)マウスが糖尿病誘発精巣萎縮症から保護されることを示す図である。ALCAT1ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注入された。ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスは注入の3日後共に高血糖症を発症した。注入後12週間後、精巣サンプルが糖尿病誘発精巣萎縮症を調節するALCAT1の役割についてH&E染色により分析された。図28Aに示すように、糖尿病の発症は野生型(WT)対照マウスにおいて精巣の萎縮をもたらした。さらに高血糖症は精原細胞の激しい損失および巨細胞(矢印で示す)の誘発を引き起こした(図28C, 拡大図28D)。対照的にこれらの欠陥はALCAT1ノックアウト(KO)マウスでは完全に消失した(図28B, 28E, 拡大図28F)。

20

【0056】

【図29A - 29D】ALCAT1ノックアウト(KO)マウスが糖尿病誘発精巣内アポトーシスから保護されることを示す図である。ALCAT1ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)対照が150mg/kg体重のストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注入された。注入後12週間後、精巣サンプルが糖尿病誘発アポトーシスについてTUNEL染色により分析された。ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスは正常血糖条件下ではアポトーシスのレベルが区別不能であった(図29A, 29B)。しかし糖尿病の発症は野生型(WT)対照マウスにおいて劇的な精巣内細胞死をトリガーし、それはTUNEL染色に対しポジティブな細胞数の増加により実証された(図29C)。対照的に、ALCAT1欠乏はALCAT1ノックアウト(KO)マウスにおいて糖尿病に伴う精巣内アポトーシスの発生を阻害した(29D)。

30

40

【0057】

【図30A - 30F】ALCAT1ノックアウト(KO)マウスが精巣内で高レベルのヌアージュ構造を発現したことを示す図である。生後3週間の野生型(WT)対照マウス(図30A, 拡大図30C)およびALCAT1ノックアウト(KO)マウス(図30B, 拡大図30D)の精巣サンプルがヌアージュ構造について分析された。ヌアージュは精巣におけるミトコンドリアのユニークな特徴である。NIH Image Jソフトウェアがヌアージュ密度(図30E)および相対的ヌアージュ面積(図30F)を定量化するのに使用された。その後密度は対照に対する隣接するミトコンドリアマトリックスの密度に対しコントラストおよび暗さを正規化された。平均値 ± SEM (n = 24)。従前の図の観察に合致して、ALCAT1欠乏は精巣におけるミトコンドリア機能性を改善したが、

50

それはALCAT1ノックアウト(KO)マウスの精巢におけるヌアージュ構造の増加により実証された。総括すると、これら結果はALCAT1阻害因子が糖尿病患者に多い欠陥である勃起不全などの糖尿病誘発性生殖退化に対する新規の治療を提供することを実証した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。

【発明を実施するための形態】

【0058】

本発明のいくつかの側面が実施例を参照して以下で記述される。多くの特定の詳細、関係、および方法が本発明の完全な理解のために提供される。しかし当業者には1つ以上の特定の詳細が無くても本発明が実施可能であり、また他の方法でも実施可能であることが理解できよう。本発明は行為またはイベントの表示された順番に限定されない、なぜならばある行為は、他の行為またはイベントと他の順番でおよび/または同時に起こりうる。さらに表示された全ての行為またはイベントが本発明にもとづく方法を実行するのに必要なわけではない。

10

【0059】

本発明の実施形態は示された理論的側面なしに実行可能である。さらに理論的側面は表示された理論に縛られることを出願人は希求しないという理解のもとに示されている。

【0060】

ここに開示される全ての遺伝子、遺伝子名、遺伝子産物は、ここに開示される組成物および方法が適用可能な、任意の種からの相同体に相当することを意図されている。従って語彙は限定されないが、ヒトおよびマウスからの遺伝子および遺伝子産物を含む。特定の種からの遺伝子および遺伝子産物が開示された場合、その開示は例示目的のためであり、文脈で明示されないかぎり、限定と解釈されるべきではない。したがって例えば、開示された遺伝子に対して、それはある実施形態では哺乳類核酸に関係し、そしてアミノ酸配列は相同性のおよび/またはオルソログな遺伝子におよび、遺伝子産物は他の動物からの遺伝子産物、例えば限定されないが、哺乳類、魚類、両性類、爬虫類および鳥などにおよぶ。好適な実施形態では、遺伝子または核酸配列はヒトである。

20

【0061】

(定義)

ここに使用される語彙は特定の実施形態のためだけであり、本発明を制限するためではない。ここで使用される「1つの」「その」は、そうでないと明示される場合を除き、複数形を包含する。さらにほん明細書または請求項で使用される「を含む」「有する」「備える」またはその変化形は、「からなる」と同様に包含する意味である。

30

【0062】

「約」「およそ」はある特定の値に対し当業者が決める許容可能な誤差範囲にあることを意味し、誤差範囲は部分的に数値が測定または決定される方法、すなわち測定システムの限界に依存する。例えば、当業界の慣習により「約」は1またはそれ以上の標準偏差の範囲内にある。あるいは「約」は所定の数値の20%までの範囲を意味し、好適には10%、より好適には5%、さらに好適には1%の範囲を意味してよい。特に生物システムまたはプロセスでは、その言葉は桁数を意味してよく、好適にはある数値の5倍以内、より好適には2倍以内である。実施形態または請求項で特定の数値が記載された場合は、特に明示されない限り、特定の数値に対する許容可能な範囲が想定されている。

40

【0063】

「代替的に」または「代わりに」はその後に記載された状況が起こっても起こらなくてもよく、記載は状況が起こる場合と起こらない場合をふくむ。

【0064】

「実証する」「測定する」「評価する」「検知する」「査定する」および「検定する」はここでは相互置換え可能に使用され、任意の形態の測定を意味し、ある要素が存在するか否かを決定することを含む。これらの用語は量的および/または質的な判定を含む。「検定する」は相対的または絶対的である。「の存在を検定する」は、存在するか否かの判定のみならず、存在する何かの量を判定することを含む。

50

【0065】

「薬剤」は疾病または他の医学的症状を防止し、緩和し、または治療する分子、化学的存在、組成物、医薬品、治療薬、化学療法薬、または生物学的薬剤を含む。この用語は小分子化合物、アンチセンス剤、siRNA剤、抗体、酵素、ペプチド、有機または無機分子、天然または合成化合物およびそれらに類するものを含む。ある薬剤は本発明の方法に従って臨床試験の任意の段階で、プレ試験の段階で、またはFDA認可に従って検定可能である。

【0066】

「ALCAT1」という用語は、制限なく、核酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチド、相補的配列、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、相同的および/またはオルソロガスなALCAT1分子、アイソフォーム、前駆体、変異体、バリエント、誘導體、スプライスバリエント、対立遺伝子、異種、およびそれらの活性フラグメントを含むことを意図している。

10

【0067】

「フラグメント」または「バリエント」とは、長さが少なくとも380アミノ酸残基で、そしてペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の近接部位に対して100%同一であるフラグメントか、または全長ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質までのフラグメントに少なくとも90%、好適には95%同一のバリエントを意味する。バリエントは、少なくとも10%、25%、50%、75%または90%のオリジナルのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の活性が保持されるのであれば、例えば従来定義されたような保存的アミノ酸置換、または非保存的置換を含んでよい。またリン酸化、糖鎖修飾、スプライスバリエントおよびそれらに類するもの、のような翻訳後修飾を持つALCAT1分子、フラグメントまたはバリエントが含まれ、それら全てはALCAT1機能の効率性に影響を与える。

20

【0068】

特に明示されないかぎり、「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」は交換可能に使用される。しかし通常は異なるサイズのペプチド配列を意味する。

【0069】

「バリエント」はポリヌクレオチド配列の文脈で使用される場合、野生型遺伝子に関係するポリヌクレオチドに及ぶ。この定義はまた、例えば、対立遺伝子の、スプライスの、種のまたは多形性のバリエントを含んでもよい。スプライスバリエントは参照分子に対し有意の同一性を持ち、しかしmRNAプロセス中のエクソンのスプライシングの変化に起因して、通常それより大きなまたは小さな数のポリヌクレオチドを持つ。その対応するポリペプチドは追加の機能ドメインを有するか、またはドメインがない。

30

種バリエントは種の間で異なるポリヌクレオチド配列である。本発明で特に使用されるバリエントは、野生型遺伝子産物のバリエントである。バリエントは核酸配列における少なくとも1回の置換変異に起因し、変化したmRNAをもたらずかまたは構造または基が変化するか変化しないポリペプチドをもたらず。任意の所定の天然または組換え遺伝子はゼロ、1、または多くの対立遺伝子形態を持ってよい。バリエントに起こる一般的な変異性変化は通常、ヌクレオチドの自然的欠乏、追加、または置換に起因する。これらのタイプの変化のそれぞれは、単独でまたは他と組み合わせて、所定の配列において1回以上発生する。

40

【0070】

結果として得られるポリペプチドは、相互比較して通常有意のアミノ酸同一性を持つ。多形性バリエントは特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列における所定の種の個体間の変異である。多形性バリエントはまた「一塩基多型(SNP)」またはポリヌクレオチド配列が一塩基分変異する単一塩基変異を包含する。SNPの存在は、例えば、1つの病態に対する傾向、すなわち感受性または抵抗性、を持一定の集団を示唆する。

【0071】

「心臓疾病」とは、心筋症、肥大性心筋症、拡張型心筋症、粥状動脈硬化、冠状動脈疾

50

患、虚血性心疾患、筋心臓炎、ウイルス感染、傷、高血圧性心疾患、心臓弁膜症、先天性心臓病、心筋梗塞、鬱血性心不全、不整脈、心臓の再構築に至る病気、その他を含む心臓病の任意の種類に及ぶ。心臓の病気は、任意の理由、例えば、収縮性の低下（例えば、減少した駆出分画率によって示される）のような心臓組織への損傷に起因する。

【0072】

不十分な心機能によって特徴づけられる心臓損傷または心不全は、正常な心機能の任意の障害または欠如、または異常な心機能の存在を含む。異常な心機能は、病気、怪我や老化の結果でありえる。ここでは異常な心機能は、心筋細胞、心筋細胞の集団または心臓自体の形態的および/または機能的異常を含む。形態的および機能的異常の非限定的な例は、心筋細胞の物理的劣化および/または死、心筋細胞の異常成長パターン、心筋細胞間の物理的結合の異常、心筋細胞による物質の過少生産または過剰生産、心筋細胞が通常生産する物質の生産の失敗、および異常なパターンまたは異常な時期での電気衝撃の伝達、を含む。より広範なレベルの異常は、運動異常、減少した駆出率、心エコー検査法で観察される変化（例えば、膨張）、心電図における変化、運動耐性の変化、減少した毛管の散水、および血管造影法によって観察される変化を含む。異常な心機能は例えば、たとえば、虚血性心疾患、例えば、狭心症、心筋梗塞、慢性虚血性心疾患、高血圧性心疾患、肺心臓病（肺性心）、心臓弁膜症；例えば、リウマチ熱、僧帽弁脱出、僧帽弁輪の石灰化、カルチノイド心臓病、感染性心内膜炎、先天性心臓病；心筋疾病、例えば、心筋炎、拡張型心筋症、高血圧性心筋症、鬱血性心不全に至る心不全；および心臓腫瘍、例えば、始原肉腫と二次腫瘍を含む。

10

20

心臓損傷はまた、例えば傷、例えば、ナイフの傷；生物学的（例えばウイルス性；自己免疫疾病）または化学的（例えば、化学療法、薬）；手術；移植などを含む。

【0073】

「脂質異常症」は、リポタンパク質の過剰生産または過少生産を含む、脂質代謝が異常である生物学的状態を意味する。リポタンパク質が一般的に過剰生産される脂質異常症は、血液中の全コレステロール、低密度リポタンパク質（LDL）コレステロールとトリグリセリド濃度の上昇をもたらし、同時に高密度リポタンパク質（HDL）コレステロール濃度の減少をともなう。

【0074】

「脂肪肝」または「肝臓脂肪症」は、肝臓が肝臓の肝細胞の中に基準レベルより大きいトリグリセリドを蓄えた状態を言う。トリグリセリドは、肝細胞内の微小および大きな液胞のどちらか又は両方に含まれる。肝臓の脂質含有量が5010重量%を超えると、診断はなされる。脂肪肝（FLD）はアルコールの摂取と関係している場合も関係していない場合もある（Reddy氏他著、Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2006, 290: G852 - G858参照）。

30

【0075】

「アルコール性脂肪肝」は被験者が平均1日20グラム超のアルコールを摂取する中での脂肪肝の状態を言う。アルコール性脂肪肝（AFLD）は基本的に1日約60グラム以上のアルコールを摂取するすべての個人に発症する。AFLDは短期間でも中量から大量のアルコール摂取の後に起こることがある。被験者は、太りすぎでないか太りすぎである。肝硬変は、これを含む。

40

【0076】

「非アルコール性脂肪肝」は、被験者が平均1日20グラム未満のアルコールを摂取する中での脂肪肝の状態を言う。被験者は、太りすぎでないか太りすぎである。

【0077】

「非アルコール性脂肪肝炎」またはNAFLDは脂肪のマクロ小嚢が発生し、肝臓で小葉性炎症を伴う非アルコール性脂肪肝炎の発症のステージを言う。脂肪のマクロ小嚢が発生し、肝臓で小葉性炎症を伴う脂肪肝炎はアルコール性脂肪肝炎においても起こりうる。

【0078】

「脂肪壊死」は、脂肪のマクロ小嚢が発生し、肝臓の小葉性炎症と気球状変性が付随した

50

非アルコール性脂肪肝のステージを言う。脂肪壊死のレベルからの非アルコール性脂肪肝（NAFLD）の更なる進行は、肝臓内の脂肪マクロ小嚢、炎症と気球状変性の存在に加えて、線維症の発症を含む。脂肪マクロ小嚢が発生し、肝臓の小葉性炎症と気球状変性が付随し、さらに線維症が発症した脂肪壊死はアルコール性脂肪肝でも起こりうる。

【0079】

「診断的」というフレーズは、病的状態の存在または性質を特定することを意味する。診断の方法は感度と無病正診率において異なる。診断検定法の「感度」は、陽性反応を示す病気にかかった個人のパーセンテージ（「本当の陽性」のパーセント）である。検定法によって検知されない罹患した個人は、「偽陰性」である。罹患しない、そして、検定法において陰性である主題は、「本当の陰性」と呼ばれる。

診断検定法の「無病正診率」は1マイナス偽陽性率である。ここで、「偽陽性」率は陽性反応を示す罹患していない個人の割合と定義される。特定の診断法が状態の決定的な診断を提供しないので、その方法が診断を補助するポジティブな徴候を提供するならば十分である。

【0080】

「診断する」というフレーズは病気または徴候を分類し、病気の激しさを判定し、病気進行をモニターし、病気の結果を予測し、および/または回復の見込みを予測する。

「検出する」という語は、選択肢として上記を任意に含む。本発明に基づく病気の診断は、被験者の生体試料の中から得られた本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの濃度の判定によって影響される可能性がある。ここで、判定されるレベルは疾病に罹患し易い素質または疾病の存在かまたは不存在と相関されてもよい。

「被験者から得られる生体試料」は、後で詳述されるように、被験者から身体的に取り除かれなかったサンプルを選択肢として含む点に留意する必要がある。

【0081】

「処置」は、進展を防止する、または、障害の病理または徴候を変える意図での干渉である。したがって、「処置」は治療的な処置と予防または防止処置の両方を意味する。「処置」は、緩和療法として特定されてもよい。処置が必要な被験者は、すでに障害を有する被験者のみならず、障害が防止されるべき被験者も含む。

腫瘍（例えば、ガン）治療において、治療剤は直接腫瘍細胞の病理を減少させるかもしれないが、他の治療剤（例えば、放射線や化学療法）による処置に対し、腫瘍細胞をより感受性にする可能性がある。したがって、病状、障害または状態の「処置する」または「処置」は、以下を含む：（1）病状に罹患するか、罹患し易い素質を持つヒトまたは他の哺乳類において発現する病状、障害または状態の臨床的兆候の発現を防止するか、遅らせる；（2）病状、障害または状態を遅らせる、すなわち、病気の進展または再発（維持治療の場合）または少なくとも1つの臨床的または準臨床的兆候を抑えるか、減らすか、遅らせる；または（3）疾病の軽減、すなわち、病状、障害または状態または少なくとも1つの臨床的または準臨床的兆候の退縮をおこさせる；処置される個人への利益は、統計的に有意であるか、少なくとも患者または医者に認識できることのいずれかである。

【0082】

化合物の「治療的に効果がある」量（すなわち、効果的投薬量）とは、治療的に（例えば、臨床的に）所望の結果を生成するのに十分な量を言う。組成物は、1日につき1回以上から1週につき1回以上投与されてよい；1日おきに1回を含む。効果的に被験者を処置するために特定の要因が投薬量およびタイミングに影響する可能性があり、その要因には、限定されないが、病気または障害（前の処置）の激しさ、以前の処置、一般的健康状態、および/または年齢、および現在罹患している他の疾病を含む。さらに、本発明の治療的に効果的な量の化合物による被験者の処置は、一回の処置または一連の処置を含む。

「予防的に効果的な量」は患者において代謝性疾病または障害の再発または拡大、または発生を防止するのに十分な薬剤の量を意味してもよい、ここで患者には限定されないが、代謝性疾病に罹患し易い患者、例えば遺伝子的に罹患し易い、または以前にアルコールのような環境要因に暴露されていた患者を含む。「予防的に効果的な量」はまた、疾病の防

10

20

30

40

50

止において予防的利益を提供する予防薬の量を意味してもよい。さらに本発明の薬剤に関する「予防的に効果的な量」は、疾病の防止に予防的利益を提供する薬剤単独の量、または他の薬剤と組み合わせた量を意味してもよい。

【0083】

「サンプル」という語は、最も広義に解釈される。「サンプル」は例えば、一つ以上の細胞、組織または流体（限定されないが、個人または細胞培養構成物から単離された、プラズマ、血清、全血、脳脊髄液、リンパ、涙、尿、唾液、ミルク、膿と組織滲出液と分泌物）のような生体試料、および例えば実験室プロセスから得られたサンプルを意味する。生体試料は細胞から単離された染色体（例えば、分裂中期染色体のスプレッド）、細胞、細胞全体または組織から単離された細胞小器官または膜、溶液内のまたはノーゼン分析用のような固体支持体に結合した、ゲノムDNAのような核酸、溶液内のまたはノーゼン分析用のような固体支持体に結合したRNA、溶液内のまたは固体支持体に結合したcDNA、溶液内のまたは固体支持体に結合したオリゴヌクレオチド、溶液内のまたは固体支持体に結合したcDNA、溶液内のまたは固体支持体に結合したペプチドまたはポリペプチド、組織、組織プリント、およびそれらに類するもの、を含んでよい。

10

【0084】

多数の周知の組織または体液収集方法が、被験体における目的の変異体のDNA、RNAおよび/またはポリペプチドのレベルを決定するために、被験体由来の生体試料を収集するために利用可能である。例としては、限定されないが、細針生検、針生検、コア針生検および外科生検（例えば、脳生検）、および洗浄を含む。使用手順に関わりなく、生検/試料が得られると変異体のレベルを判定でき、したがって診断が可能となる。

20

【0085】

本発明によれば、従来の分子生物学、微生物学、組換えDNA、免疫学、細胞生物学、および当技術分野の他の関連技術が使用されてよい。例えば、Sambrookら編、(2001)分子クローニング：実験室マニュアル。第3版。コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス：コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク；Sambrookら編、(1989)分子クローニング：実験室マニュアル。第2版。コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス：コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク；Ausubelら編、(2005)分子生物学の最新プロトコル。ジョン・ワイリー・アンド・サンズ株式会社：ホーボーケン、ニュージャージー州；Bonifacinoら編、(2005)細胞生物学におけるカレント・プロトコル。ジョン・ワイリー・アンド・サンズ株式会社：ホーボーケン、ニュージャージー州；コリガンら編、(2005)免疫学、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社カレント・プロトコル：ホーボーケン、ニュージャージー州；Coicoら編、(2005)微生物学、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社、カレント・プロトコル：ホーボーケン、ニュージャージー州；コリガンら編。タンパク質科学(2005)カレント・プロトコル、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社：ホーボーケン、ニュージャージー州；エンナら編。(2005)薬理学ジョン・ワイリー・アンド・サンズ株式会社：ホーボーケン、ニュージャージー州のカレント・プロトコルは、Hamesら編。(1999)タンパク質発現：実践的アプローチ。オックスフォードUniversity Press：オックスフォード；フレッシュニ
ー編(2000)動物細胞の培養：ワイリー・リス編、基本技術のマニュアル。第4版。
；をとりわけ参照。上記にリストアップされたもののカレント・プロトコルは、年に数回更新される。

30

40

【0086】

ALCAT1の組成物および調節薬剤

好ましい実施形態において、医薬組成物は、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1)の阻害剤を含む。別の好ましい実施形態において、医薬組成物は、1つまたはそれ以上の用量濃度のアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1)の複数の阻害剤を含む。別の好ましい実施形態において、組成物は、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT

50

1) の阻害剤と少なくとも1つの他の治療剤を含む。例えば、第二の治療剤は、特定の症状を治療するものであってもよい。別の例では、薬剤は、例えば、異常な細胞増殖のような疾患の別の態様を標的とする。この場合、薬剤は、癌患者の治療に使用される化学療法剤であろう。

【0087】

マイトフュージン-2 (MFN2) はミトコンドリアの完全性、融合、代謝および小胞体 (ER) との繫留に必要とされるミトコンドリアタンパク質をコードする。ヒトにおけるMFN2の変異は、末梢神経障害およびシャルコー・マリー・トゥース病の原因となる。MFN2欠乏は、肥満および2型糖尿病を伴うミトコンドリア機能不全に関連している。筋肉のMFN2の発現は、2型糖尿病患者において減少される。MFN2の発現は、肥満と負に相関し、インスリン感受性と正相関する。肥満手術による2型糖尿病におけるインスリン抵抗性の改善は、筋肉においてMFN2の発現を増加させる。同様に、インスリン感受性を改善することが知られている適度な運動は、MFN2発現およびミトコンドリア合成を有意に増加させる。さらに、マウス骨格筋におけるMFN2の標的欠失は、mtDNAの不安定性および高い変異率の原因となり、激しいmtDNA欠失につながる。

10

【0088】

カルジオリピン (CL) は酸化リン酸化のために必要な重要なミトコンドリアのリン脂質である。CLは、リノール酸におけるその豊富な含有量とミトコンドリア内膜のROS産生の場所近くの位置に起因して、CL過酸化として知られているプロセス、活性酸化種 (ROS) によるCL二重結合の酸化損傷に非常に敏感である。CLはミトコンドリアで唯一のリン脂質であり、それはアポトーシスの間の初期の酸化を受け、アポトーシスはサイトゾルへのシトクロムcの放出を誘発し、それはアポトーシス性消費につながる。したがって、病理学的再構築からの異常CLアシル組成物は、一般に、糖尿病、肥満、心血管疾患、神経疾患、癌、老化、および他の年齢関連疾患 (クレイプルー SM & ケーラー CM 編 (2012) 健康と病気におけるカルジオリピンの複雑さ、Trends Biochem Sci. Jan; 37 (1): 32-41) を伴うミトコンドリア機能不全の病因に関係づけられてきた。

20

【0089】

ALCAT1はROS生産、ミトコンドリア機能障害、およびインスリン抵抗性につながる、糖尿病、肥満症、および心筋症における酸化ストレスにตอบสนองしてCLの病理学的再構築を触媒することが最近確認されたリゾカルジオリピン・アシル基転移酵素である。アシル補酵素A: リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) によるCL再構築はまた、CL欠乏、リノール酸の枯渇、およびCLでのドコサヘキサエン酸 (DHA) 含有量の豊富化など、を含む加齢に伴う疾患、を彷彿とさせる、CLアシル組成物の変化をもたらす。

30

ALCAT1の標的不活化は食餌誘導性肥満およびその関連する代謝合併症の発症を防ぐ。

【0090】

好ましい実施形態において、組成物は、アシル補酵素A: リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) の調節剤を含む。好ましくは、調節剤はALCAT1の発現、機能および/または活性を阻害する。

40

【0091】

別の好ましい実施形態において、アシル補酵素A: リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1) を含む組成物は、患者におけるミトコンドリア機能不全を防止または処置するために使用される。患者におけるミトコンドリア機能不全は、代謝疾患またはその障害を伴う。例としては、限定されないが: 糖尿病、脂肪肝、不妊症、神経変性疾患、神経炎症性疾患、肥満、癌、自己免疫疾患、脳障害、腎疾患、肝疾患、心疾患、筋肉疾患、勃起不全、閉経、代謝性疾患または障害、老化関連疾患、などを含む。

【0092】

50

別の好ましい実施形態において、ミトコンドリア機能不全をインビトロまたはインビボで防止または処置する方法は、細胞または患者に、リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素の発現、活性、機能またはそれらの組み合わせを調節する薬剤を、治療有効量だけ投与することを含む。好適には、リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素はアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) である。

【0093】

別の好ましい実施形態では、ALCAT1の調節剤は：ミトコンドリアヌクレオチド、ミトコンドリアポリペプチド、ミトコンドリアタンパク質、mtDNAコピー数；ミトコンドリアの質量；ミトコンドリアの形態；ミトコンドリア融合、とmtDNA変異率を調節する。好ましくは、ミトコンドリアタンパク質は、マイトフュージン、マイトフュージン-1(MFN1)、マイトフュージン-2(MFN2)、そのプロヒピチン、ペプチド、フラグメント、バリエーション、変異体またはそれらの組み合わせを含む。

10

【0094】

ある実施形態では、マイトフュージン分子は必要に応じて、1つ以上のALCAT1阻害剤と共に患者に投与される。ここでALCAT1の阻害剤は、ベースライン対照と比較してMFN2の発現、機能または活性を増大させる。別の実施形態では、ALCAT1の阻害剤は、活性酸素種(ROS)により測定されるように、通常のベースライン対照と比較して酸化ストレスを減少させる。他の好適な実施形態では、ALCAT1の阻害剤は、カルジオリピン(CL)の構造、機能、活性、発現またはこれらの組み合わせを調節する。

20

【0095】

別の好ましい実施形態では、インビトロまたはインビボでミトコンドリア機能不全を防止または処置する方法は、細胞または患者へマイトフュージン分子の治療的有效量を投与することを含む。好ましい実施形態において、マイトフュージン分子は：マイトフュージン-1(MFN1)、マイトフュージン-2(MFN2)、それらのフラグメント、バリエーション、変異体、またはそれらの組み合わせを含む。好ましくは、マイトフュージンは、MFN2である。

【0096】

ある実施形態ではアシル補酵素 A : リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素 1 (ALCAT1) の阻害薬は、必要に応じて、細胞又は患者に投与される。好ましい実施形態において、ALCAT1の阻害薬は、ベースライン対照と比較して、MFN2の活性、発現または機能を増加させる。ALCAT1の阻害薬の有効性の他の測定は、活性酸素種(ROS)により測定される酸化ストレスを測定し、そして通常のベースライン対照と比較することを含む。別の好ましい実施形態では、ALCAT1の阻害剤は、カルジオリピン(CL)の構造、機能、活性、発現、またはそれらの組み合わせを調節する。

30

【0097】

心臓機能障害、神経変性およびその他の疾患：

増加した酸化ストレスは心肥大と機能不全に関与していると思われる。酸化ストレスの減衰は、左心室再構築と機能障害を防ぐことができる。酸化ストレスは、心筋症および心機能不全の病因に関連付けられてきたミトコンドリアの機能障害およびインスリン抵抗性の主要な原因因子であると考えられている。すべてのリン脂質の中でも、豊富な多価不飽和脂肪酸における含有量とROS産生部位の近くの位置に起因して、CLは反応性酸素種(ROS)によるCLの二重結合の酸化的損傷、それは脂質過酸化反応として知られているが、非常に敏感である。したがって、CLはアポトーシスの間に早期に酸化を受ける、ミトコンドリアにおける唯一のリン脂質である。CL過酸化の根底にある分子メカニズムは未解明のままであるが、増加したDHAはCLを酸化的損傷に高感度にし、それは脂質過酸化およびミトコンドリア機能障害の悪循環をもたらすことが示されている。その結果、DHA含有量はCL欠乏と同時に高齢者の心臓において増大する。心筋細胞の虚血再灌流障害は、CLの過酸化を引き起こし、それはチトクロームcオキシダーゼ活性の有意な減少につながり、それは外部から追加されたCLによってのみ回復し、他のリン脂質または過酸化CLによっては回復しない。詳細には、ヒトにおける甲状腺機能亢進症の発症は

40

50

、高レベルの酸化ストレスおよびCLの過酸化と関連し、それは甲状腺機能正常によって軽減することができる。甲状腺機能亢進症はげっ歯類においてCL再構築を刺激し、それは多価不飽和脂肪酸と過酸化可能指数の有意な増加をもたらす。

【0098】

上述したように、ALCAT1は、ROS産生、ミトコンドリア機能障害、およびインスリン抵抗性につながる、糖尿病、肥満症、および心筋症における酸化ストレスに応答してCLの病理学的再構築を触媒する。ALCAT1によるCLの再構築はまた、TLCLの欠乏とDHAの富化を含む、心臓疾患におけるものを連想させるアシル組成物を有するCLの生成に繋がる。本研究の結果は、酸化ストレスと心機能障害の病因における酵素ALCAT1の役割を証明する。

10

【0099】

好ましい実施形態では、心筋症罹患または心筋症のリスクにさらされる患者を治療する方法は、それを必要とする患者に、有効治療量のアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1（ALCAT1）の阻害剤を投与することを含む。

【0100】

別の好ましい実施形態では、心筋症罹患または心筋症のリスクにさらされる患者は正常で健康な対照と比較して、PTEN誘導推定キナーゼ1（PINK1）が欠乏している。好ましい実施形態では、ALCAT1の阻害剤は、ベースライン対照と比較して増加したPINKの発現、機能または活性の結果を示した場合にALCAT1の阻害剤と同定される。

20

【0101】

好ましい実施形態では、心筋症罹患または心筋症のリスクにさらされる患者は、BNP、-MHC、ANFまたはACTA1の肥大を発現する。実施形態では、ALCAT1阻害剤は、1つ以上のこれらのマーカーの複数の発現をベースライン対照と比較して調節する。

【0102】

いくつかの実施形態では、心筋症罹患または心筋症のリスクにさらされる患者を処置する方法は、その心筋症、障害または症状を治療するために、治療計画の一部として、それを必要とする患者に1つ以上の治療化合物を投与することを含む。

30

【0103】

別の実施形態では、神経疾患または障害に罹患している患者を治療または予防する方法は、治療上有効量の1つまたは複数のALCAT1調節剤を患者に投与することを含む。神経学的疾患または障害は、神経系および/または視覚系の任意の障害を指す。「神経障害」は、中枢神経系（脳、脳幹および小脳）、末梢神経系（脳神経を含む）、および自律神経系（そのうちの一部は中枢および末梢神経系の両方に位置している）が関与する障害を含む。神経変性疾患は、例えば、アルツハイマー病、脳卒中、多発性硬化症等を含む。

【0104】

以下、本発明による組成物および方法を用いて処置可能ないくつかの神経疾患、症状、徴候および症候群の一覧である：後天性てんかん様失語症；急性散在性脳脊髄炎；副腎白質ジストロフィー；加齢関連黄斑変性；脳梁無形成；失認；アイカルディ症候群；アレキサンダー病；アルパーズ病；交互性片麻痺；アルツハイマー病；血管性認知症；筋萎縮性側索硬化症；無脳症；アンジェルマン症候群；血管腫症；無酸素症；失語症；失行；くも膜嚢胞；くも膜炎；Anron1-キアリ奇形；動静脈奇形；アスペルガー症候群；血管拡張性失調症；注意欠陥多動性障害；自閉症；自律神経機能障害；背中の痛み；パッテン病；ベーチェット病；ベル麻痺；良性本質的眼瞼けいれん；良性焦点；筋萎縮症；良性頭蓋内圧亢進症；ピンスヴァンガー病；眼瞼けいれん；ブロッホサルズパーガー症候群；腕神経叢損傷；脳膿瘍；脳損傷；脳腫瘍（多形性膠芽腫を含む）は、；脊髄腫瘍；ブラウンセカール症候群；カナバン病；手根管症候群；灼熱；中枢性疼痛症候群；橋中央ミエリン溶解；頭部障害；脳動脈瘤；脳

40

50

動脈硬化症；脳萎縮；脳性巨人症；脳性麻痺；シャルコー・マリー・トゥース病；化学療法誘発性神経障害および神経障害性疼痛；キアリ奇形；舞踏病；慢性炎症性脱髄性多発神経障害；慢性疼痛；慢性局所疼痛症候群；コフィンローリー症候群；遷延性植物状態を含む昏睡；先天性顔面両側麻痺；大脳皮質基底変性；頭蓋動脈炎；頭蓋骨癒合症；クロイツフェルト・ヤコブ病；蓄積外傷疾患；クッシング症候群；サイトメガロ封入体病；サイトメガロウイルス感染；ダンス目ダンスの足症候群；ダンディ・ウォーカー症候群；ドーソン病；DeMorsier症候群；デジェリン・クルンプケ麻痺；認知症；皮膚筋炎；糖尿病性神経障害；びまん性硬化症；自律神経障害；書字障害；失読症；ジストニア；早期乳児てんかん性脳症；エンプティセラ症候群；脳炎；脳ヘルニア；脳三叉神経領域血管腫症；てんかん；エルブ麻痺；本態性振戦；ファブリー病；ファール症候群；失神；家族性痙性麻痺；熱性けいれん；フィッシャー症候群；フリードライヒ失調症；前頭側頭型認知症および他の「タウオパチー」；ゴーシェ病；ゲルストマン症候群；巨細胞性動脈炎；巨細胞性封入体病；グロボイド細胞白質ジストロフィー；ギラン・バレー症候群；HTLV-1 - 関連脊髄症；ハレルフォルデン・スパッツ病；頭部外傷；頭痛；片側顔面痙攣；遺伝性痙性対麻痺；遺伝性多発神経炎性失調；耳ヘルペス；带状疱疹；平山症候群；HIV関連認知症および神経障害（AIDSの神経学的症状も）；全前脳症；ハンチントン病及び他のポリグルタミンリピート疾患；水無脳症；水頭症；副腎皮質ホルモン過剰症；低酸素症；免疫介在性脳脊髄炎；封入体筋炎；色素失調症；乳児フィタン酸蓄積症；乳児レフサム病；乳児痙攣；炎症性筋疾患；頭蓋内嚢胞；頭蓋内圧亢進；ジュベール症候群；カーズ - セイヤー症候群；ケネディ病キンスボーン症候群；クリッペル・ファイル症候群；クラッペ病；クーゲルベルク・ヴェランダー病；クーラー；ラフォラ病；ランバート・イトン筋無力症候群；ランドウ・クレフナー症候群；延髄外側（パレンベリー）症候群；学習障害；リー病；レノックス・ガスター症候群；レッシュ・ナイハン症候群；白質ジストロフィー；レビー小体型認知症；脳回欠損；ロックイン症候群；ルー・ゲーリック病（すなわち、運動ニューロン疾患または筋萎縮性側索硬化症）；腰椎椎間板疾患；ライム病 - 神経学的後遺症；マシャド・ジョセフ病；小脳髄症；巨大脳髄症；メルカーソン - ローゼンタール症候群；メニエール病；髄膜炎；メンケス病；異染性白質ジストロフィー；小頭症；片頭痛；ミラーフィッシャー症候群；ミニストローク；ミトコンドリア性筋症；メビウス症候群；単量体筋萎縮症；運動ニューロン疾患；モヤモヤ病；ムコ多糖症；多発脳梗塞性認知症；多巣性運動ニューロパチー；多発性硬化症および他の脱髄性疾患；起立性低血圧と多系統萎縮症；P筋ジストロフィー；重症筋無力症；ミエリン破壊性拡散硬化症；乳児ミオクローヌス脳症；ミオクローヌス；筋症；先天性筋緊張症；ナルコレプシー；神経線維腫症；神経遮断薬悪性症候群；AIDSの神経学的症状；狼瘡の神経学的後遺症；神経性筋緊張病；神経セロイドリポフスチン症；ニューロン遊走障害；ニーマン・ピック病；オサリバン・マクラウド症候群；後頭神経痛；オカルト脊椎癒合不全配列；大田原症候群；オリブ橋小脳萎縮症；眼球クローヌスミオクローヌス；視神経炎；起立性低血圧；酷使症候群；知覚異常；パーキンソン病；先天性パラミオトニア；腫瘍随伴疾患；発作性発作；パリーロンバーグ症候群；ペリツェウス・メルツバッハ病；周期性麻痺；末梢神経障害；痛みを伴う神経障害および神経障害性疼痛；遷延性植物状態；広汎性発達障害；光くしゃみ反射；フィタン酸蓄積症；ピック病；ピンチ神経；下垂体腫瘍；多発性筋炎；孔脳；ポリオ後症候群；带状疱疹後神経痛；感染後脳脊髄炎；起立性低血圧；ブラダー・ウィリー症候群；原発性側索硬化症；プリオン病；進行性片側顔面萎縮；進行性多巣性白質脳症；進行性硬化性ポリオジストロフィー；進行性核上性麻痺；偽脳腫瘍；ラムゼイ・ハント症候群（I型およびII型）；ラスムッセン脳炎；交感神経性ジストロフィー症候群。レフサム病；反復運動障害；反復性ストレス障害；下肢静止不能症候群；レトロウイルス関連脊髄症；レット症候群；ライ症候群；聖ヴィートのダンス；サンドホフ病；シルダー病；裂脳症；中隔視神経異形成症；揺さぶられっ子症候群；带状疱疹；シャイ・ドレーガー症候群；シェーグレン症候群；睡眠時無呼吸；ソト症候群；痙攣；二分脊椎；脊髄損傷；脊髄腫瘍；脊髄性筋萎縮症；スティッフ・パーソン症候群；脳卒中；スタージ

10

20

30

40

50

・ウェーバー症候群；亜急性硬化性全脳炎；皮質下動脈硬化性脳症；シデナム舞蹈病；失神；脊髄空洞症；遅発性ジスキネジー；テイ・サックス病；側頭動脈炎；繫留脊髄症候群；トムセン病；胸郭出口症候群；疼痛性チック；トッドの麻痺；トゥレット症候群；一過性脳虚血発作；伝染性海綿状脳症；横断性脊髄炎；外傷性脳損傷；振戦；三叉神経痛；熱帯性痙性対麻痺；結節性硬化症；血管性認知症（多発梗塞性認知症）；側頭動脈炎を含む血管炎；フォン・ヒッペル・リンドウ病；ヴァレンベルク症候群；ウェルドニッヒホフマン病；ウェスト症候群；むち打ち症；ウィリアムズ症候群；ウィルソン病；およびツェルヴェーガー症候群。

【0105】

別の好ましい実施形態では、ALCAT1調節剤の投与が自己免疫疾患を患っている患者を防止または処置する。自己免疫疾患の例には、以下を含む：慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（IBDs）、ここに炎症性腸疾患（IBDs）は多遺伝子感受性を伴う慢性炎症状態であるクローン病（CD）および潰瘍性大腸炎（UC）を含む。

10

【0106】

別の好ましい実施形態では、ALCAT1調節剤の投与が糖尿病性腎症および関連障害に罹患している患者を防止または処置する。そのような障害の例は、糖尿病性心臓線維症である。他の例としては、糖尿病誘発の精巣におけるアポトーシスおよびヌアージュ形成である。

【0107】

別の好ましい実施形態では、ALCAT1は、代謝性疾患の治療法またはミトコンドリア機能障害に関連する任意の疾患または障害に対する、疾患の進行または結果もしくは応答または耐性についての予後マーカーである。

20

【0108】

ALCAT1調節剤：

好ましい実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1（ALCAT1）の調節剤を同定する方法は、試験薬剤と生体試料を接触させるステップと、および生体試料中のマイトフュージン分子の発現、機能または活性を測定するステップとを有する。好ましい実施形態において、試験薬剤が、マイトフュージン分子、例えばMFN2の発現、機能または活性をベースライン対照と比較して増大させる場合、試験薬剤はALCAT1の阻害剤として同定される。

30

【0109】

別の好ましい実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1（ALCAT1）の調節剤を同定する方法は、試験薬と生体試料を接触させるステップと、心筋症を示す以下の肥大のマーカーの発現を測定するステップを含む：BNP、MHC、ANFまたはACTA1。好ましい実施形態では、試験薬剤が心筋症を示す肥大マーカーの発現をベースライン対照と比較して減少させる場合、試験剤はALCAT1の阻害剤として同定される。

【0110】

別の好ましい実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1（ALCAT1）の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法は、試験剤との生体試料を接触させるステップと；糖尿病性腎症を示す以下の核酸マーカーまたはそのコードされた産物の発現を測定するステップと：FAS、TNF、TGFB、DGAT1、CHREBP1、またはSREBP1；を有する。好ましい実施形態では、試験薬剤がFAS、TNF、TGFB、DGAT1、およびSREBP1の発現をベースライン対照と比較して調節する場合、試験剤はALCAT1の阻害剤として同定される。

40

【0111】

別の好ましい実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1（ALCAT1）の発現、機能または活性の調節剤を同定する方法は、試験剤との生体試料を接触させるステップと；脂肪肝疾患を示す以下の核酸マーカーまたはそのコード

50

された産物の発現を測定するステップと：PPAR、Srebp1c、FAS、ACC1、DGAT1、またはCPT1、を有する。好ましい実施形態において、試験薬剤がPPAR、Srebp1c、FAS、ACC1、DGAT1、またはCPT1の発現をベースライン対照と比較して調節する場合、試験剤は、ALCAT1の阻害剤として同定される。

【0112】

脂肪肝疾患の例としては、NAFLD、アラジール症候群、 α -1-アンチトリプシン欠損症、自己免疫性肝炎、胆道閉鎖症、慢性肝炎、肝癌、肝硬変、肝嚢胞、脂肪肝、ガラクトース血症、ギルバート症候群、原発性胆汁性肝硬変、肝炎A、肝炎B、肝炎C、原発性硬化性胆管炎、ライ症候群、サルコイドーシス、チロシン血症、糖原病I型、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、および新生児肝炎を含む。

10

【0113】

他の好ましい実施形態では、アシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1)の発現、機能または活性の調節剤はここに示される実施形態により同定される。

【0114】

他の好ましい実施形態では、医薬組成物は、ここで実施された方法によって同定されたアシル補酵素A：リゾカルジオリピン・アシル基転移酵素1 (ALCAT1)の阻害剤を含む。

【0115】

生体試料は、患者例えば細胞、体液などから得ることができる。試料はまた、合成された、例えばペプチド、オリゴヌクレオチド等でありうる。試料はまた形質転換細胞、所望の分子を発現するベクターを形質導入された細胞であってもよい。したがって実施形態では、生体試料は：体液、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、細胞、組織、またはそれらの組み合わせを含む。

20

【0116】

多種多様な薬がALCAT1および関連する分子を標的とするために使用可能である。例えば、関連する分子は、ALCAT1のメカニズムに關与する任意の分子であり得、また、経路における上流または下流でよい。例えば、薬剤は、例えばcDNAまたは調節領域に基づいて、アンチセンス阻害剤およびリボザイムのようなDNAベース薬剤を使用して、分子を調節することができ、それらはRNAレベルにおいてのみならず、標的分子遺伝子のイントロンおよびエクソンの両方を標的とするために使用できる。

30

【0117】

あるいは、薬剤は、標的分子の三次元タンパク質構造を含むアミノ酸配列に基づいて分子を標的とすることができる。例えば、ヒト抗体、非ヒトモノクローナル抗体およびヒト化抗体などのタンパク質ベースの薬剤を、特にALCAT1上の異なるエピトープを標的とするために使用することができる。ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えばALCAT1発現を阻害する、ALCAT1のプロモーター部位に特異的に結合するための高親和性阻害剤として機能することができる。薬剤は、適しているであろう薬剤、例えば、MFN2、肥大マーカーまたはPTEN誘導性推定上キナーゼ1 (Pink1)発現の調節剤を同定するために、所望の結果を用いて、さまざまな手段によって識別することができる。また、ALCAT1発現、機能または活性は、当技術分野で公知の任意の検定法によって判定することができる。詳細はまた、下記の実施例の節に記載されている。

40

【0118】

標識分子：

別の好ましい実施形態では、ALCAT1分子、ALCAT1調節剤等は、放射性標識化することができる。用途には、診断および予後目的のための治療およびイメージングが含まれる。標識は、放射性原子、酵素又は発色団基であってもよい。抗体を標識するための方法は、例えば、ハンターとグリーンウッド著、ネイチャー、144：945 (1962)およびデビッドら著、生化学13：1014-1021 (1974)に記載されてい

50

^8F , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , または ^{32}P のような通常のイメージング放射性同位元素が使用できる。ガドリニウム 153 などの核磁気共鳴 (NMR) イメージング・エンハンサーもまた、NMR による検出のために複合体を標識するために使用することができる。ポリヌクレオチドまたはタンパク質部分のいずれかで、標識化を行うための方法および試験薬は、当技術分野で公知と考えられている。

【0126】

小分子：

薬剤の別の例は、小分子である。ALCAT1 の調節剤として、小分子を同定するために、小分子試験化合物は、最初は有機又は無機の化学ライブラリの構成物であってよい。本明細書で使用する「小分子」は、分子量約 3,000 ダルトンを下回る重さの分子の小さな有機または無機分子を指す。小分子は、天然物またはコンビナトリアルケミストリーライブラリの構成物でもよい。多様な分子の 1 組が、電荷、芳香族性、水素結合、柔軟性、サイズ、側鎖の長さ、疎水性、及び剛性などのさまざまな機能をカバーするために使用されるべきである。小分子を合成するのに適したコンビナトリアル技術は、当該技術分野で知られており、例えば Obrecht と Villalgorido 著、小分子重量化合物ライブラリの固体支持コンビナトリアルおよびパラレル合成、ペルガモン・エルゼビア・サイエンス社 (1998) で例示され、「スプリットプール」または「パラレル」合成技術、固相および溶液相技術、および符号化技術を含む (Czarnik 著、Curr. Opin. Chem. Bio., 1:60 (1997) 参照)。また、多くの小分子ライブラリは、市販されている。

10

20

【0127】

小分子は、1 以上の上記官能基で置換された、環状炭素または複素環構造および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含むことができる。小分子として興味があるのは、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体またはそれらの組み合わせを含む生体分子の中に見出される構造である。そのような化合物は、関心のものを同定するためにスクリーニングすることができ、ここで多様な異なるスクリーニングプロトコルが既存技術分野において知られている。

【0128】

小分子は、合成または天然化合物のライブラリを含む多種多様な供給源から得ることができる、自然発生のまたは合成の化合物に由来できる。例えば、多数の手段が、ランダム化オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの調製を含む、多種多様の有機化合物および生体分子のランダムおよび指向性合成のために利用可能である。あるいは、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリが利用可能であるか、または容易に産生される。さらに、天然または合成的に作製されたライブラリおよび化合物は、従来の化学的、物理的および生化学的手段により容易に修飾可能であり、またコンビナトリアルライブラリを生成するのに用いることができる。既知の小分子は、構造的類似体の生成のため、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等のような指向性またはランダムな化学修飾に供してもよい。

30

【0129】

このように、小分子は、コンビナトリアル手段を経て生成された化合物のライブラリ、すなわち、化合物の多様性コンビナトリアルライブラリを含む、自然発生または合成のライブラリから得ることができる。コンビナトリアルライブラリ、ならびに生産およびスクリーニングする方法は、当技術分野で公知である。

40

【0130】

化学ライブラリ：

コンビナトリアルケミストリーの発展は数百、数千の、個別の化合物の迅速かつ経済的な合成を可能にする。これらの化合物は、典型的には、効率的なスクリーニングのために設計された低分子の中規模のライブラリに配置されている。コンビナトリアル法は、新規化合物の同定に適した公平なライブラリを生成するために使用することができる。また、単一の親化合物から生成された、以前に決定された生物学的活性を持つ子孫のより小さく、

50

より多様なライブラリを生成可能である。いずれの場合においても、重要な酵素の阻害剤のような、コンビナトリアル化学により産生される治療関連生物学的分子を特異的に標的とする効率的なスクリーニングシステムの欠如は、これらのリソースの最適な使用を妨げる。

【0131】

コンビナトリアル化学ライブラリは、多くの試験薬のような化学「ビルディングブロック」を組み合わせることにより、化学合成または生物学的合成のいずれかによって生成された多様な化合物の集合である。例えば、ポリペプチドライブラリのような線形コンビナトリアル化学ライブラリは、1組の化学的ビルディングブロック（アミノ酸）を多数の組み合わせで、そして潜在的にあらゆる可能な方法で、所定の化合物長（すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数）に対して組み合わせることによって形成される。何百万もの化学化合物を化学的ビルディングブロックのそのようなコンビナトリアル混合によって合成することができる。

10

【0132】

「ライブラリ」は2 - 50,000,000の多様なメンバー化合物を含んでよい。ライブラリは好ましくは、少なくとも48の多様な化合物、より好ましくは96以上の多様な化合物、さらにより好ましくは384以上の多様な化合物、より好ましくは10,000以上の多様な化合物、好ましくは100,000以上の多様なメンバーであり、最も好ましくは1,000,000以上の多様なメンバー化合物を含む。「多様な」とは、ライブラリ中の50%を超える化合物が、ライブラリの他のメンバーと同一ではない化学構造を有することを意味する。好ましくは、ライブラリ中の75%以上の化合物がコレクションの他のメンバーと同一ではない化学構造を有し、より好ましくは90%、最も好ましくは約99%以上。

20

【0133】

コンビナトリアル化学ライブラリの調製は当業者に公知である。レビューのために、トンブソンら著、小分子ライブラリの合成と適用、Chem Rev 96:555-600、1996；ケナンら著、コンビナトリアル形状ライブラリで分子多様性を探る、Trends Biochem Sci 19:57-64、1994；ジャンダ著、タグなし対タグ有りライブラリ：コンビナトリアル化学ライブラリの作製およびスクリーニングのための方法、Proc Natl Acad Sci USA 91:10779-85、Leblら著、1ピース1構造のコンビナトリアルライブラリ、biopolymers 1994:6444-6448米国。、；エル・プラットら、、バイオポリマー37:177-98、1995；アイヒラーら著、ペプチド、ペプチド模倣物、および有機合成コンビナトリアルライブラリ、Med Res Rev. 15:481-96、1995；Chabalala著、固相コンビナトリアルケミストリーとリードを識別するための新たなタグ付けの方法、Curr Opin Biotechnol, 6:632-9、1995；Doll著、コンビナトリアルケミストリーを介した酵素阻害剤の発見、Mol Divers. 2:223-36、1997；Fauchererら著、ロボットで合成された水溶性のライブラリを使用したペプチドおよび非ペプチドリードの発見、Can J. Physiol Pharmacol. 75:683-9、1997；アイヒラーら著、合成コンビナトリアルライブラリの生成と活用、Mol Med Today 1:174-80、1995；および、ケイら著、ファージディスプレイされたコンビナトリアルペプチドライブラリからの酵素阻害剤の同定、Comb Chem High Throughput Screen 4:535-43、2001参照。

30

40

【0134】

化学的多様性ライブラリを作製するため、他の化学的性質も使用することができる。このような化学反応としては限定されないが、ペプチド（PCT公報WO91/19735）；コードされたペプチド（PCT公報WO93/20242号）；ランダムバイオオリゴマー（PCT公報WO92/00091）；ベンゾジアゼピン（米国特許第5,28

50

8, 514号); ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチドのような、ダイバーソマー(ホップズら著、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、90: 6909-6913(1993)); ビニル性ポリペプチド(萩原ら著、J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568(1992)); -D-グルコース足場での非ペプチド性ペプチド模倣(Hirschmannら著、J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218(1992)); 小化合物ライブラリの類似有機合成(チェンら著、J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661(1994)); オリゴカルバメート(チョーら著、Science、261: 1303(1993)); および/またはペプチジルホスホネート(Campbellら著、J. Org. Chem. 59: 658(1994)); 核酸ライブラリ(Ausubel、バーガーおよびSambrook、すべて前掲); ペプチド核酸ライブラリ(例えば、米国特許第5, 539, 083); 抗体ライブラリ(例えば、ヴォーンら著、ネイチャー・バイオテクノロジー、14(3): 309-314(1996)およびPCT/US96/10287); 炭水化物ライブラリ(例えば、Liangら著、Science、274: 1520-1522(1996)および米国特許第5, 593, 853); 小有機分子ライブラリ(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum著C&Eニュース、1月18日、33ページ(1993)); イソプレノイド(米国特許第5, 569, 588)。チアゾリジノンおよびメタチアザノン(米国特許第5, 549, 974); ピロリジン(米国特許。第5, 525, 735および5, 519, 134); モルホリノ化合物(米国特許第5, 506, 337); ベンゾジアゼピン(米国特許第5, 288, 514号); などが挙げられる。

10

20

【0135】

コンビナトリアルライブラリの調製のためのデバイスは市販されている(例えば、357MPS、390MPS、Advanced Chem. Tech社、ケンタッキー州ルイビル; シンフォニー、レイニン社、マサチューセッツ州ウォーバーン; 433A Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティー; 9050 Plus、ミリポア社、マサチューセッツ州ベッドフォード)。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリ自体が市販されている(例えば、ComGenex、ニュージャージー州プリンストン; Asinex、モスクワ、ロシア; トライポス社、ミズーリ州セントルイス; ChemStar(株)、モスクワ、ロシア; 3DPharmaceuticals、ペンシルベニア州エクストン; マーテクバイオサイエンス、メリーランド州コロンビア、など)。

30

【0136】

A L C A T 1 および関連分子を標的とすることに加えて、結合部位または信号サイトに対し競合する薬剤もまた使用してもよい。

【0137】

実施形態では、薬剤がA L C A T 1プロモーターの相互作用を調節する。薬剤の例としては、限定されないが: 抗体、アプタマー、RNAi、小分子。転写因子-DNA結合の組み立てを妨害し、従って、複合体形成を阻害する、特定の合成または天然のペプチドの高親和性結合。いくつかの側面では、薬剤は(例えばsiRNAによって)A L C A T 1発現を阻害する。

40

【0138】

本発明の一実施形態では、例えば、A L C A T 1に結合する単離された抗体、またはこれらの抗体の断片を含む。既存技術分野で公知のように、抗体は、例えば、ポリクローナル、オリゴクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、および/または完全ヒト抗体でありうる。本明細書に記載される本発明の実施形態では、これらの抗体を産生するための細胞をも提供する。

【0139】

干渉RNA:

製造の詳細な方法は、当業者に公知の多数の技術を用いて得ることができる。例えば、siRNAは、Tuschiiら著の米国特許出願公報2002/0086356に記載の

50

ショウジョウバエ *in vitro* システムのような当技術分野で公知の方法を用いて化学合成または組み換えにより生成可能であり、この公報の全体は参照により本明細書に採り入れられる。

【0140】

標的 mRNA の RNAi 媒介分解を引き起こす、所定の標的配列を含む RNAi の能力は、細胞中の RNA またはタンパク質のレベルを測定するための標準的な技術を使用して評価することができる。例えば、本発明の RNAi は、培養細胞に送達することができ、そして標的 mRNA のレベルは、ノーザンブロットまたはドットブロット技術または定量 RT-PCR によって測定することができる。所与の標的配列を含む siRNA による標的 mRNA の RNAi 媒介性分解はまた、マウスモデルなどの動物モデルで評価することができる。標的 mRNA の RNAi 媒介分解は、上記のように mRNA 又はタンパク質を単離及び定量するための標準的な技術を用いて、被験者の細胞における標的 mRNA またはタンパク質のレベルを測定することにより、検出することができる。

10

【0141】

好ましい実施形態では、siRNA 分子は、所望のセンス/アンチセンス遺伝子座の重複する領域を標的とし、それによって、センスおよびアンチセンス転写物の両方を調節する、例えば、デンドリン (*dendrin*) を標的にする。別の好ましい実施形態において、組成物は1つまたは2つ以上の siRNA および/または siRNA の組み合わせの siRNA 分子からなり、siRNA は所望の標的遺伝子座に重複し、および/またはセンスおよびアンチセンスの両方(重複またはその他)を標的とする。これらの分子は、任意の疾患または異常の潜在的な治療のために所望の任意の標的に向けることができる。理論的にはどの分子を標的とすべきかには制限がない。さらに、本明細書で教示される技術は、治療をそれぞれの個体に対し調整することを可能にする。

20

【0142】

好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは個別の治療に合わせて調整することができる、例えば、これらのオリゴヌクレオチドは、個人での対立遺伝子変異体に特異的な配列であり得、ターゲットの上方制御または阻害は、例えば、対照と比較して10%、20%、40%、100%の発現のような、異なる度合いで操作できる。つまり、ある患者では10%の標的遺伝子の発現を増加または減少させることが効果的であり、それに対して別の患者では80%が有効であり得る。

30

【0143】

遺伝子発現の調節(上方制御または阻害)は、内因性標的 RNA または標的 RNA の翻訳によって産生されるタンパク質のいずれかを測定することによって定量化することができる。RNA およびタンパク質を定量するための技術は、当業者に知られている。特定の好ましい実施形態では、遺伝子発現は少なくとも10%、好適には少なくとも33%、さらにより好適には少なくとも50%、またさらに好適には少なくとも80%、阻害される。本発明の特に好ましい実施形態では、生物中の細胞内において遺伝子発現は少なくとも90%、より好適には、少なくとも95%阻害され、また少なくとも99%から100%まで阻害される。特定の好ましい実施形態(例えば MFN2、PINK1)では、遺伝子発現は、少なくとも10%、好適には少なくとも33%、さらにより好適には少なくとも50%、またさらに好適には少なくとも80%、上方制御される。本発明の特に好ましい実施形態では、生物中の細胞内において遺伝子発現は少なくとも90%、より好適には、少なくとも95%上方制御され、また少なくとも99%から100%まで上方制御される。

40

【0144】

適切な RNAi の選択は、自動的に核酸配列を整列させ、同一性または相同性の領域を示すコンピュータプログラムを使用することによって促進される。このようなプログラムは、例えば、GenBank のようなデータベースを検索することによって、または PCR 産生物の配列決定によって、得られた核酸配列を比較するために使用される。一定の範囲の種からの核酸配列の比較は、種間の適切な程度の同一性を表示する核酸配列の選択を

50

可能にする。配列決定されていない遺伝子の場合には、標的種および他の種の遺伝子間の同一性の程度の決定を可能にするためにサザンブロットが行われる。当技術分野でよく知られているように、ストリンジェンシーの程度を変化させて、サザンブロットを行うことにより、同一性の近似測定値を得ることができる。これらの手順は、被験者の標的核酸配列に対し高度の制御されるべき相補性を示し、そして他の種における対応する核酸配列に対し低い相補性の程度を示す、RNAiの選択を可能にする。当業者は、本発明において使用される遺伝子の適切な領域を選択することによりかなりの許容範囲があることを理解するであろう。

【0145】

好ましい実施形態では、低分子干渉RNA (siRNA) は、RNAそのもの、またはDNAとして、アプタマーまたは当該分野で公知の任意の他のタイプの送達媒体を使用して細胞に送達される。特定の実施形態では、本開示の核酸分子は個別に合成され、合成後に例えばライゲーションにより (ムーアら著、Science 256 : 9923、1992 ; ドレーパーら著、PCT公開番号WO93 / 23569 ; Shabarovaら著、Nucleic Acids Res . 19 : 4247、1991 ; Beilonら著、ヌクレオシドとヌクレオチド16 : 951、1997 ; Beilonら著、biconjugate Chem . 8 : 204、1997)、または合成または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより接合されてもよい。

10

【0146】

さらなる実施形態では、干渉を媒介するオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドをコードし、それらの発現を宿主細胞内に指向させるベクターによって発現される単一または複数の転写産物として生成可能である。本開示の siRNA またはその類似体は、さらに、ヌクレオチド、非ヌクレオチドまたはアプタマーおよび siRNA を接合する混合ヌクレオチド / 非ヌクレオチドリンカーからなってもよい。ある実施形態では、ヌクレオチドリンカーは、長さが約2ヌクレオチド長から約50ヌクレオチド長までのリンカーであり得る。別の実施形態では、ヌクレオチドリンカーは核酸アプタマーであり得る。本明細書において使用される「アプタマー」または「核酸アプタマー」とは、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、ここにおいて当該核酸分子は、その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプタマーは、標的分子が天然には核酸に結合しない、標的分子に結合する核酸分子であり得る。標的分子は被験者とする任意の分子であり得る。例えば、アプタマーは、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合するために使用することができ、それによってタンパク質と天然に存在するリガンドの相互作用を防止する。これは非限定的な例であり、当業者は、一般に当該分野で公知の技術を用いて他の実施形態を容易に作ることができることを認識するであろう (例えば、Goldら著、Annu . Rev . Biochem . 64 : 763、1995 ; プロディとゴールド著、J . Biotechnol 74 : 5、2000 ; Sun著、Curr . Opin . Mol . Ther . 2 : 100、2000 ; クッサー著、J . Biotechnol . 74 : 27、2000 ; ヘルマンとパテル著、サイエンス287 : 820、2000 ; およびJayasen著、Clinical Chem . 45 : 1628、1999参照)。

20

30

40

【0147】

本発明は、タンパク質がコードする遺伝子産物に対してだけでなく、非タンパクがコードする遺伝子産物に対しても使用することができる。非タンパク質コード遺伝子産物の例は、リボソームRNA、トランスファーRNA、小さな核RNA、小さい細胞質RNA、テロメラーゼRNA、DNA複製、染色体再編成などに関与するRNA分子をコードする遺伝子産物含む。

【0148】

本発明によれば、siRNAオリゴヌクレオチド療法は、遺伝子からの標的mRNAに接触 (と相互作用) する、投与された siRNAオリゴヌクレオチドを含み、それにより遺伝子の発現が調節される。発現のこのような調節は、適切には対照に対し少なくとも約

50

10%または20%の違いであることができ、より好ましくは被験者に対し少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の発現の差があつてよい。特に、siRNAオリゴヌクレオチドの接触することが、対照と比較して完全なまたは本質的に完全な発現をもたらすこと、例えば対照と比較して少なくとも約95%、97%、98%、99%または100%の発現の阻害または増加をもたらすことは特に好ましい。このような調節を判定するための対照サンプルは、siRNAオリゴヌクレオチドと接触されていない(インビトロまたはインビボ)比較しうる細胞であり得る。

【0149】

別の好ましい実施形態では、siRNA中の核酸塩基は、標的mRNAに対しより高い特異性と親和性を提供するように修飾されてもよい。例えば、核酸塩基はLNAモノマーと置換されてもよく、それは隣接範囲、または異なる位置にあることができる。修飾siRNAは、好ましくは、標的配列に対し相補的配列より高い会合定数(K_a)を有する。標的配列に対する修飾または非修飾siRNAの結合は、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて多様なストリンジェンシー条件下で、以下の実施例記載のようにインビトロで判定可能である。

10

【0150】

キメラ/修飾RNAi:

本発明に従って、当業者は、mRNAが、翻訳開始コドンおよび停止コドンを含む、三文字遺伝子コードを用いてタンパク質をコードするための情報を伝送するコード領域のみならず、5'非翻訳領域、3'非翻訳領域、5'キャップ領域、イントロン領域およびイントロン/エクソンまたはスプライス部位リボヌクレオチドとして当業者に既知の領域を形成する随伴性リボヌクレオチドを含んでいることを理解するであろう。したがってオリゴヌクレオチドは本発明に従って製剤化することができ、それはコードリボヌクレオチドのみならず、完全にまたは部分的にこれら随伴性リボヌクレオチドに対しても標的化される。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、mRNAの翻訳開始部位(AUGコドン)、またはコード領域内の配列、5'非翻訳領域または3'非翻訳領域を標的とする。干渉されるべきメッセンジャーRNAの機能は、タンパク質翻訳部位へのRNAの転座、RNAからのタンパク質の実際の翻訳、RNAのスプライシングまたは成熟化、およびRNAにより仕向けられる独立した触媒活性も可能性として含む、全ての重要な機能を含む。RNA機能に対するこのような干渉の全体としての効果は、タンパク質発現に対する干渉を引き起こすことである。

20

30

【0151】

他の薬剤:

これらには、任意の合成または天然のペプチド、糖タンパク質、酵素、シグナル伝達の調節剤、転写または翻訳因子複合体の形成の阻害剤、有機または無機分子等を含むことができる。

【0152】

本発明の他の実施形態は、任意の標的化バインダー、本明細書に記載される抗体またはそれらのフラグメントをコードする単離核酸分子、単離核酸分子を有するベクター、または任意のこれら核酸分子により形質転換された宿主細胞を含む。本発明の実施形態はまた、抗体産生のために宿主細胞に形質導入されたときに、抗体またはその断片の収量を増加させるために最適化された核酸配列を含む、本発明の抗体の抗体またはその断片をコードする任意の核酸分子を含む、ことを理解する必要がある。

40

【0153】

マイクロアレイ:

ALCAT1および関連分子に結合することができる核酸配列の同定は、それぞれのユニークな核酸が規定された位置に位置して配列を形成するように、基板表面上に核酸のライブラリを固定化することによって達成することができる。一般に、核酸の固定化されたライブラリは、核酸への生体分子の結合に有利な条件下で、生体分子または候補薬剤に曝露される。非特異的に結合する生体分子は、所望の結合特異性のレベルに応じて、軽度か

50

らストリンジェントな緩衝液条件を使用して洗い流される。核酸配列は、次いで、どの核酸配列が生体分子に結合しているかを判定するために分析される。好ましくは、生体分子は、結合した核酸の位置の検出に使用するための蛍光タグを有している。

【0154】

核酸配列の固定化されたアレイを用いる検定法は、未知の核酸の配列の決定；一塩基多型（SNP）分析；特定の種、組織、細胞型、遺伝子同定からの遺伝子発現パターンの解析；その他に使用できる。

【0155】

目的の遺伝子発現産物をコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断的使用はPCRの使用を含み得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成され、酵素的に生成され、または*in vitro*で産生することができる。オリゴマーは、好ましくは、発現産物をコードするポリヌクレオチドの断片、またはポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、特定の遺伝子の同定のために最適化された条件下で使用される。オリゴマーはまた、密接に関連するDNAまたはRNA配列の検出または定量のため、低ストリンジェントな条件下で使用されてもよい。

10

【0156】

さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチドまたは任意のポリヌクレオチド配列に由来するより長い断片は、マイクロアレイの標的として使用することができる。マイクロアレイは、多数の遺伝子および遺伝子転写物の同一性および/または発現レベルを同時にモニターし、標的遺伝子またはその産物が相互作用する遺伝子を同定し、および/または例えば神経障害を媒介する遺伝子発現産物の調節における候補治療薬の有効性を評価するために使用され得る。この情報は、遺伝子機能を決定するために、そして治療剤の活性を発現させそして監視するために使用することができる。

20

【0157】

マイクロアレイは公知方法を使用して準備され、使用され、そして分析できる（例えば、Brennanら、1995、米国特許第5,474,796；Schenarら著、1996、Proc.natl.Acad.Sci.U.S.A.93:10614-10619；Baldeschweilerら、1995、PCT出願W095/251116；シャロンら、1995、PCT出願W095/35505；ヘラーら、1997、Proc.natl.Acad.Sci.U.S.A.93:2150-2155；およびヘラーら、1997、米国特許第5,605,662参照）。他の実施形態では、マイクロアレイは、ペプチド、又は候補薬剤を同定するために検定することができる他の所望の分子を含む。

30

【0158】

薬物スクリーニングのための別の技術は、目的のタンパク質に対して適切な結合親和性を有する化合物の高生産性のスクリーニングを提供する（例えば、Geysenら、1984、PCT出願W084/03564参照）。この方法では、多数の異なる小型のテスト化合物が固体基質上で合成される。試験化合物は、同定された遺伝子、またはその断片と反応させられ、洗浄される。結合した分子は、その後、当技術分野で周知の方法によって検出される。あるいは、非中和抗体が、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するために使用することができる。

40

【0159】

本発明のスクリーニングの方法は、所望の活性を有する1つまたは複数の化合物を多様な分子のライブラリから同定するためのスクリーニング検定法を使用するステップを含む。「スクリーニング検定法」は、予め選択された活性を有するコレクション内で、化合物を同定、単離、および/またはその構造を決定するように設計される、選択的検定法である。「同定」とは、所望の活性を有する化合物が単離され、その化学構造が決定され（限定されないが、核酸およびポリペプチドのそれぞれヌクレオチドおよびアミノ酸配列を判定することを含む）、そして、追加的または代替的に、スクリーニング活性を有する精製化合物の構造が決定されることを意味する。生化学的および生物学的検定法は、タンパク

50

質 - タンパク質相互作用から、酵素触媒、小分子 - タンパク質結合、細胞機能に至るまでの広範囲のシステムにおける活性を試験するように設計されている。

このような検定法には自動化、半自動化検定法およびHTS（ハイスループットスクリーニング）検定法が含まれる。

【0160】

HTS法では、試験化合物が同時に又はほぼ同時に所望の活性についてスクリーニングされるように、多くの個別の化合物が好ましくはロボット化、自動または半自動の方法によって並行して試験される。本発明の統合されたシステムを使用して、1日に約6,000 - 20,000、そして約100,000 - 1,000,000までもの異なる化合物をスクリーニングすることが可能である。

10

【0161】

典型的にHTSでは、標的分子は投与されるか、適切な対照を含む修飾された受容体を有する単離された細胞を用いて培養される。

【0162】

ある実施形態では、スクリーニングするステップは、ターゲットとリガンドとの間の複合体が形成できる条件の下で、各細胞培養を多様なライブラリのメンバー化合物、このうちのいくつかはターゲットのリガンドであるが、と接触させるステップと、そして、ライブラリのどのメンバーがこのような複合体に存在するかを同定するステップと、を有する。別の非制限的な様式では、スクリーニングは、酵素によって触媒される反応の産物または反応物が検知可能な信号を生成する条件下で、標的酵素を多様なライブラリのメンバー化合物、そのうちのいくつかはターゲットの阻害薬（又は賦活剤）であるが、を接触させるステップを有する。後者の様式では、標的酵素の阻害剤は、検出可能な生成物からの信号を減少させるか、検出可能な反応物からの信号を増加させる（又は賦活剤についてその逆）。

20

【0163】

ある実施形態では、本発明はここに具体化された分子（例えばALCAT1、またはALCAT1、MFN2、PTENの調節剤）のいずれか、または天然に存在するか組換えのこれらの分子タンパク質のいずれかを発現する、細胞もしくは組織を使用して、可溶性検定法を提供する。別の実施形態では、本発明は、例えば、ALCAT1分子またはその断片が固相基質に付着した、ハイスループット形式の固相パースのインビトロ検定法を提供する。本明細書に記載の任意の検定法はハイスループットスクリーニング、例えば、リガンド結合、細胞増殖、細胞表面マーカーフラックス、放射性標識されたGTP結合、セカンドメッセンジャーのフラックス、例えばCa²⁺、IP3、cGMP、またはcAMP、サイトカイン産生、などに適合させることができる。可溶性又は固体のいずれかの本発明のハイスループット検定法においては、一日に数千の異なる調節剤またはリガンドをスクリーニングすることが可能である。

30

【0164】

この方法は、*in vitro*でALCAT1のタンパク質に対し使用可能であり、またはALCAT1タンパク質を含む細胞ベースまたは膜ベースの検定法のために使用できる。具体的には、マイクロタイタープレートの各ウェルは、選択された潜在的調節剤に対して別々の検定を実行するために使用することができ、または、濃度またはインキュベーション時間の効果が観察されるべきであり、5 - 10ウェルごとに単一の調節剤を試験することができる。このように、単一の標準マイクロタイタープレートは、約100（例えば、96）の調節剤を検定することができる。1536ウェルプレートが使用される場合、単一のプレートは簡単に約100 - 約1500の異なる化合物を検定することができる。これは、一日あたり多くのプレートを検定することが可能である；約6,000、20,000、50,000または100,000以上の異なる化合物のためのアッセイスクリンが本発明の統合システムを用いて可能である。

40

【0165】

固相反応に対しては、被験者のタンパク質またはその断片、例えば、目的のタンパク質

50

またはその断片を融合タンパク質の一部として含む細胞外ドメイン、または細胞もしくは膜は、共有結合または非共有結合、例えばタグを介して直接または間接的に固体相構成要素に結合することができる。タグは多様な構成要素のいずれかであり。一般に、タグ（タグバインダー）と結合する分子は、固体支持体に固定され、被験者のタグ付き分子は、タグおよびタグバインダーの相互作用によって固体支持体に付着される。

【0166】

多くのタグおよびタグバインダーが、文献に記載された公知の分子相互作用に基づいて使用できる。例えば、タグが、例えばビオチン、プロテインA、またはプロテインGの天然のバインダーを有する場合、適切なタグバインダー（アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、免疫グロブリンのFc領域など）と併せて使用することができる。10
ビオチンなどの天然のバインダーを有する分子に対する抗体も広く入手可能であり、適切なタグバインダーである；SIGMA免疫化学、1998カタログ（SIGMA、ミズーリ州セントルイス）を参照。

【0167】

同様に、任意のハプテン性または抗原性の化合物が、適切な抗体と組み合わせてタグ/タグバインダーペアを形成するのに使用することができる。数千の特異的抗体が市販されており、多くのさらなる抗体が文献に記載されている。例えば、1つの一般的な構成において、タグは第一抗体であり、タグバインダーは第一抗体を認識する第二抗体である。抗体-抗原相互作用に加えて、受容体-リガンド相互作用もまた、タグ-タグバインダーペアとして適切である。例えば、細胞膜受容体のアゴニストおよびアンタゴニスト（例えば、20
トランスフェリン、c-kit、ウイルス受容体リガンド、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、インターロイキン受容体および抗体、カドヘリンファミリー、インテグリンファミリー、セレクションファミリー等のような細胞受容体-リガンド相互作用；例えば、ピゴット&パワー著、接着分子の事実ブックI（1993）参照）。同様に、毒素および毒液、ウイルスエピトープ、ホルモン（例えば、アヘン剤、ステロイドなど）、細胞内受容体（例えば、ステロイド、甲状腺ホルモン、レチノイドおよびビタミンDを含むさまざまな小リガンドの効果を媒介する；ペプチド）、薬物、レクチン、糖、核酸（線状および環状ポリマー構成の両方）、オリゴ糖、タンパク質、リン脂質および抗体は、すべて、さまざまな細胞受容体と相互作用することができる。

【0168】

ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリ尿素、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミドおよびポリアセテートなどの合成ポリマーもまた、適切なタグまたはタグバインダーを形成することができる。この開示を見た当業者には明らかであるように、多くの他のタグ/タグバインダー対はまた、本明細書に記載の検定システムにおいて有用である。30

【0169】

ペプチド、ポリエーテルなどの一般的なリンカーもタグとして機能することができ、そして約5 - 200アミノ酸のポリグリシン配列などのポリペプチド配列を含む。このような柔軟なリンカーは当業者に知られている。例えば、ポリ（エチレングリコール）リンカーは、シェアウォーターポリマーズ社、アラバマ州ハンツビルから入手可能である。これら40
のリンカーは、必要に応じて、アミド結合、スルフヒドリル結合、またはヘテロ官能性結合を有する。

【0170】

タグバインダーは、現在利用可能な多様な方法のいずれかを使用して固体基板に固定されている。固体基板は、一般にタグバインダーの一部と反応する化学基を表面に固定する化学試験薬に、基板の全部または一部を露出させることによって誘導体化されもしくは官能性を持たされる。例えば、長い鎖部分への付着に適した基には、アミン、ヒドロキシル、チオール、及びカルボキシル基を含む。アミノアルキルシランおよびヒドロキシアルキルシランは、ガラス表面のようなさまざまな表面を官能化するために使用することができる。そのような固相バイオポリマーアレイの構築は文献に十分に記載されている。例えば50

、メリフィールド著、*J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 - 2154 (1963) (例えば、ペプチドの固相合成を記載) ; Geysenら、*J. Immun. Meth.* 102: 259 - 274 (1987) (ピン上での固相成分の合成を記載する) ; フランク & Doring、*Tetrahydro* 44: 6031 - 6040 (1988) (セルロースディスク上のさまざまなペプチド配列の合成を記載する) ; フォーダーら、*Science*、251: 767 - 777 (1991) ; シェルドンら。*臨床化学* 39 (4) : 718 - 719 (1993) ; および Kozalら、*Nature Medicine* 2 (7) : 753 - 759 (1996) (これらは全て固体基板に固定されたバイオポリマーのアレイを記載) を参照。基質にタグバインダーを固定する非化学的アプローチは、熱、UV照射による架橋などの他の一般的な方法を含む。

10

【0171】**患者への組成物の投与**

本明細書に記載の方法によって同定された組成物または薬剤は、任意の適切な製剤においてヒトを含む動物に投与することができる。例えば、タンパク質分解を調節するための組成物は、生理食塩水又は緩衝塩溶液などの薬学的に許容される担体または希釈剤において製剤化することができる。適切な担体および希釈剤は、投与様式および投与経路および標準的薬務に基づいて選択することができる。典型的な薬学的に許容される担体及び希釈剤および医薬製剤の説明は、レミントンの薬学、この分野の標準的テキスト、およびUSP/NFに記載されている。安定化および/または組成物を保持するために他の物質が組成物に添加されてもよい。

20

【0172】

本発明の組成物は、任意の従来技術により動物に投与されてもよい。組成物は、例えば、内部または外部標的部位への外科的送達により、または血管によってアクセス可能な部位にカテーテルによって、標的部位に直接投与することもできる。他の送達方法、例えば、リポソーム送達または組成物を含浸させた装置からの拡散は、当技術分野で知られている。組成物は、単回ボラス、複数回の注射、または連続注入(例えば、静脈内注射)によって投与されてもよい。非経口投与の場合、組成物は、好ましくは、滅菌されたパイロジェンフリーの形態で製剤化される。

【0173】

薬剤または化合物は、1つ以上の療法と共に投与することができる。化学療法剤は、メトロノーム的投薬計画で投与されてもよい。本明細書で用いる「メトロノーム」療法は、治療剤の連続的な低用量の投与を指す。

30

【0174】

そのような化合物の用量、毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における標準的薬学手順、例えば、LD₅₀(集団の50%に対して致死的な用量)およびED₅₀(集団の50%において治療的に有効な用量)に対して決定することができる。毒性と治療効果の間の用量比は治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を使用することもできるが、非感染細胞への潜在的損傷を最小限にし、それによって、副作用を低減するために、このような化合物を罹患組織の部位へ標的化する送達系を設計するように注意を払うべきである。

40

【0175】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトに使用される用量範囲を処方するのに用いることができる。このような化合物の用量は、ほとんどまたは全く毒性のないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。用量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変動し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物に対して、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイから最初に推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定されるIC₅₀(すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成するように処方することができる。このような情報は、ヒトにおける有用な用量を

50

より正確に決定するために用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

【0176】

化合物の治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、治療上（例えば、臨床的に）望ましい結果をもたらすのに十分な量を意味する。組成物は、1日1回または複数回から1週間に1回または複数回まで投与することができ；1日おきに1回を含む。当業者は、被験者を有効に治療するために必要な用量およびタイミングに影響する一定の要因を理解しよう。それは、限定されないが、疾患または障害の重症度、以前の治療、被験者の全般的健康および/または年齢、および現在の他の疾病、を含む。また、本発明の化合物の治療有効量による被験者の治療は、単回治療または一連の治療を含むことができる。

10

【0177】

製剤：

組成物は単独で投与することは可能であるが、それは、医薬製剤として提供することが好ましい。活性成分は、局所投与に対し、0.001 - 10重量%、例えば、薬剤の重量に対し1% - 2%含んでいてもよい。10%程度を含んでもよいが、好適には5%を超えない、より好ましくは薬剤重量0.1% - 1%である。本発明の局所製剤は、活性成分と共に一つまたはそれ以上の許容される担体および、必要に応じて任意の他の治療成分を含む。担体は、製剤の他の成分と両立でき、その受容者に有害でないという意味で「許容可能」でなければならない。

【0178】

局所投与に適した製剤は、眼、耳、または鼻への投与に適したリニメント剤、ローション、クリーム、軟膏またはペースト、および点滴薬などの、皮膚を通して治療が必要とされる部位への浸透に適した液体または半液体製剤を含む。本発明に係る点滴薬は、無菌の水溶性または油性溶液または懸濁液を含んでもよく、そして活性成分を、殺菌および/または殺真菌剤及び/又は任意の他の適切な防腐剤の、そして好適には界面活性剤を含む、適切な水溶液中に溶解することによって調製することができる。次いで、得られた溶液を清澄化し、濾過により滅菌し、そして無菌性技術により容器に移してもよい。点滴薬に含めるのに適した殺菌剤の例および殺真菌剤は、硝酸または酢酸フェニル水銀（0.002%）、塩化ベンザルコニウム（0.01%）および酢酸クロルヘキシジン（0.01%）である。油性溶液の調製に適した溶媒には、グリセロール、希釈アルコールおよびプロピレングリコールが含まれる。

20

30

【0179】

本発明に係るローションは、皮膚または眼への適用に適したものが挙げられる。眼用ローションは、所望により殺菌剤を含む無菌水溶液を含むことができ、点滴剤の調製と同様の方法により調製することができる。皮膚への適用のためのローションまたはリニメント剤はまた、例えばアルコールまたはアセトンのような皮膚の乾燥を促進させ冷却する薬剤、および/またはグリセロールまたは、ヒマシ油もしくは落花生油などの油、などの保湿剤、を含んでもよい。

【0180】

本発明に係るクリーム、軟膏またはペーストは、外用のための活性成分の半固体製剤である。それらは微粉または粉末形態の活性成分を、単独でまたは水性または非水性流体中の溶液または懸濁液中において、適切な機械の助けを借りて、グリース状または非グリース状ペーストと混合することによって製造することができる。ペーストは硬質、軟質または流動パラフィン、グリセロール、蜜蝋、金属石鹸などの炭化水素；粘液；アーモンド、トウモロコシ、落花生油、ヒマシ油またはオリーブ油などの天然由来の油；羊毛脂もしくはその誘導体、またはステアリン酸もしくはオレイン酸などの脂肪酸、およびプロピレングリコールまたはマクロゲルなどのアルコールである。製剤は、アニオン性、カチオン性、又はソルビタンエステルまたはそのポリオキシエチレン誘導体のような非イオン性界面活性剤などの任意の適切な界面活性剤を組み込むことができる。天然ゴム、セルロース誘導体、または珪質シリカなどの無機材料、およびラノリンなどの他の成分のような、懸濁剤も

40

50

また含まれてもよい。

【0181】

本発明のさまざまな実施形態を上述したが、これらは例示のためだけであり、限定を目的とせず提示されていることを理解すべきである。開示された実施形態に対する多くの変更は、本発明の精神または範囲から逸脱することなく本明細書の開示に従って作製することができる。したがって、本発明の範囲は上述の実施形態のいずれによっても限定されるべきではない。

【0182】

本書に記載のすべての文書は、ここに参照され本明細書に組み込まれる。各個別の刊行物または特許文書は個別にそのように示されたように、本出願で引用された全ての刊行物および特許文献は同程度に全ての目的のために参考として援用される。この文書に記載されているさまざまな参考文献のそれらの引用により、出願人は、任意の特定の参照がその発明に対する「先行技術」であることを認めていない。本発明の組成物および方法の実施形態は、以下の実施例に例示されている。

10

【0183】

(実施例)

以下の限定されない実施例は本発明の選ばれた実施形態を説明するのに役立つ。比率の変化や組成物の要素の変更は当業者にとって自明であり、それらは本発明の実施形態の範囲内にあることを理解されたい。

【0184】

20

(実施例1：ALCAT1によるカルジオリピン再構築はMFN2発現の調節を介してミトコンドリア生合成およびmtDNA忠実性を制御する)

本研究はALCAT1が酸化ストレスに伴うミトコンドリア機能不全を調節する分子メカニズムの理解を深めることを目的としている。プロセスのなかでミトコンドリアの融合およびmtDNAの忠実性の調節における予期せぬALCAT1の役割、それは年齢関連疾病におけるMFN2不足およびミトコンドリア分裂におけるALCAT1の重大な役割を意味する、が確認された。

【0185】

(材料と方法)

【0186】

30

ALCAT1ノックアウトマウス：

ALCAT1ノックアウトマウスの生成および酸素消費速度(OCR)の測定は以前に記載されている(Li J他著(2010)、Cell Metab 12(2):154-165)。全ての実験は同腹子の対照を使用し、そして動物愛護機関の承認に従い、また国立衛生研究所(NIH)ガイドライン(NIH出版番号86-23、1985)に準拠したプロトコルを使用した。

【0187】

試験薬：

本研究に使用される抗体はプロヒビチンおよびカルネキシンに対するモノクローナル抗体を含み、それらはSanta Cruz Biotechnology社(カリフォルニア州サンタクルズ)より購入した。MNF1, MNF2, OPA1に対するモノクローナル抗体はAbcam社より購入した。ロバ抗ラビットおよびロバ抗マウスIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ接合抗体はGEヘルスケア(ニュージャージー州、Piscataway)より購入した。ロバ抗ラビットおよびロバ抗マウスフルオレセインイソチオシアネート(FITC)接合抗体はSanta Cruz Biotechnology社より購入した。カルボニルシアニドp-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン(FCCP)、ロテノン、アンチマイシン、オリゴマイシン、およびジフェニレンヨードニウムサルフェート(DPI)はInvitrogenより購入した。

40

【0188】

動物飼育：

50

生後4 - 6週間のオスおよびメスのC57BL/6Jマウスをジャクソン・ラボラトリ（メイン州、Bar Harbor）より購入した。すべての動物には環境的に施設内で、昼行性日照、自由な水へのアクセスのもと、餌は標準的な齧歯動物用食餌（ウィスコンシン州、マジソン、Harland Teklad 2018）がResearch Diets社（ニュージャージー州、New Brunswick; Cat. #D12492）からの高脂肪食餌を与えた。動物に関係する全ての実験は認可された機関の動物飼育に従い、かつ国立衛生研究所（NIH）ガイドライン（NIH出版番号86 - 23、1985）に準拠したプロトコルを使用した。

【0189】

免疫蛍光共焦点顕微鏡法および画像分析：

免疫蛍光染色のため、細胞は4%パラホルムアルデヒドで10分間固定され、PBSで2度洗浄され、0.1%トリトンX-100で10分間透過処理された。固定された細胞は5%ウシ血清アルブミンを含むPBS内で室温でプリインキュベートされた。細胞は1次抗体（抗Mycモノクローナル抗体、1:500希釈）で3時間室温で染色され、その後FITC（1:1000希釈、Santa Cruz）と接合した2次抗体でインキュベートされた。ミトコンドリアの染色のため、細胞はミトトラッカーレッド（最終濃度100nM）で5分間37℃のインキュベーター内で染色され、PBSで3度、各洗浄5分で洗浄された。細胞はその後パイポラー温度制御装置を備える共焦点顕微鏡法（ライカTCS SP2 AOBSS）で分析された。画像はアドビフォトショップ7.0を使用して処理され、そして定量分析がImageJ（国立衛生研究所）を使用して実施された。全ての実験は少なくとも3回行われ、類似の結果を得た。

【0190】

電子顕微鏡（EM）分析：

細胞は4%パラホルムアルデヒドおよび5%グルタルアルデヒドで固定され、2%OsO₄と1%酢酸ウラニルで逐次染色され、連続的なエタノール洗浄で脱水素され、そして切片作成と分析のためEmbed-812レジンに埋め込まれた。サンプルはJEOL 1200EX透過型電子顕微鏡を使用して分析された。

【0191】

mtDNA変異検定法：

mtDNAの単離のため、MEFおよびC2C12細胞がホモジナイズされ、そしてミトコンドリア部分が前述のように（Li氏他著、Cell Metab 12(2):154-165, 2010）単離された。その後ミトコンドリアは0.5%SDSと10mMトリスHCl、0.15M NaCl、および0.005M EDTA内の0.2mg/mlプロテイナーゼKの存在のもとで溶解された。mtDNAはその後フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製された。ランダム変異捕獲検定法が以前に記載したように（Chen氏他、2010、Cell 141(2):280-289）実施された。簡単に言うと、mtDNAはTaqIで5時間消化され、その後96穴フォーマット内で希釈され、TaqI制限サイトに変異を含むmtDNAゲノムを検知するためTaqI制限サイトに隣接するプライマーでプローブされた。プライマーの対照ペアが調査されるmtDNAの量を検知するために使用された。PCRがABI STEPONE PLUS（登録商標）および95 SYBR（登録商標）GREEN PCR Master Mixを使用して20μl反応において実施された。量的PCR増幅が以下のプログラムを使用して実施された：ステップ1、95℃で10分；ステップ2、15秒；ステップ3、60℃で1分；ステップ4、ステップ2に40回戻る；ステップ5、メルトカーブを65℃から95℃まで。

【0192】

ミトコンドリア融合検定法：

ALCAT1またはベクター対照を安定して発現するC1C12細胞が6cm²当たり5×10⁵で播かれ、そしてミトコンドリア標的緑色蛍光タンパク質（mtEGFP）またはミトコンドリア標的dsRED2（mtDsred2）をそれぞれ形質移入された。

30時間後、それぞれmtEGFPとmtDsrred2を発現する個々の細胞プールは1:1の比率で混合され13mm丸形カバースリップの上に一緒にプレートされた。融合は6時間後、PBS (Sigma)内の50% (重量/容積) PEG-1500溶液での60秒の処置と、それに続く10%ウシ胎児血清 (FCS)を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)内での広範な洗浄により誘導された。タンパク質合成を阻害するため、シクロヘキシミド (20 µg/ml)が融合30分前に添加され、すべてが溶液とその後使用される細胞培養媒体で保存され、その後細胞はPBS内の氷温度の4%フォルムアルデヒドで10分間固定された。PBSで3回洗浄したのちカバースリップはスライドに搭載され、そして暗箱内において4で一昼夜保管された。

【0193】

マウス胚性線維芽細胞 (MEF) 調製:

12.5胎生期のメスのマウスを安楽死させた。胎仔が切除されハंकス液 (HBSS)と共に皿にのせられた。頭、手足、および内臓は取り除かれた。残りの胎仔はメスまたは剃刀の刃で分割され、そして4mlのコラゲナーゼ溶液の入った15ml管に送入され、その後4mlで皿を洗浄し全ての胚性部材を得た。管は37のインキュベーターの中で全ての組織塊がなくなるまで30-60分回転された。消化された溶液は100ミクロンメッシュで濾過されて冷たいDMEM (30ml)で満たされた50ml管に移された。サンプルは1200rpmで5分間遠心分離され、そして細胞ペレットは再び25mlのDMEMで洗浄された。その後細胞は完全な媒体とともに播かれた。

【0194】

XF24生体エネルギー検定法:

酸素消費速度 (OCR)がシーホースXF24分析器 (Seahorse Bioscience)を使用して既に記載 (Li氏他著、Cell Metab 12(2):154-165, 2010)のように測定された。平衡の後、検査薬は酸素センサーカートリッジの試験薬送達室に事前導入され、そしてXF呼吸測定器が基礎酸素消費速度を読んだ後にウェルに注入された。酸素消費速度 (pmol/分)が得られた。ベースラインの測定の後、検定媒体中に事前ロードされた70 µlの試験薬がそれぞれのウェルに注入され、所望の濃度に達した。その後化合物の細胞タンパク質に対する露出を促進するため2分間混合され、そしてOCR測定が実施された。

【0195】

統計分析:

統計的比較が、2つのC2C12細胞の間およびALCAT1^{-/-}と野生型マウスの差異を測定するため両側非対t検定を使用して行われた。データは平均±SEMで表示され、p<0.05は統計的に有意であるとみなされた。

【0196】

結果:

【0197】

C2C12細胞において、ALCAT1はおよびmtDNAの不安定性の原因となる:

ALCAT1はリゾカルジオリピン・アシル基転移酵素であって、病理学的にカルジオリピンの再構築を触媒し、糖尿病および肥満における活性酸素種 (ROS)の生成およびミトコンドリア機能不全に繋がる。ROSはミトコンドリア分裂の原因となり、それは加齢に関連する疾病と考えられてきた。ここではALCAT1の過剰発現の役割がミトコンドリア調節において研究され、そしてC2C12細胞系における小胞体 (ER)形態が安定的にフラッグ付けされたALCAT1 cDNA (C2C12-A1)またはベクター対照 (C2C12-V)で形質移入された。C2C12-A1細胞におけるALCAT1のmRNA発現レベルがC2C12-V細胞より3倍だけ大きく (図8)、そして糖尿病または肥満の発症により誘導されたALCAT1発現レベルに適合する。図1A-1Iに示されるように (図1Cで定量化)、ALCAT1過剰発現はミトコンドリア分裂を引き起こし、それはC2C12-A1細胞における95%超の分裂したミトコンドリアにより証明される。さらにALCAT1過剰発現は、電子顕微鏡分析で分析されたように、C2C

10

20

30

40

50

12 - A1細胞において短小化したミトコンドリアおよびミトコンドリア膨化をもたらした(図1E、拡大図1G)。さらに、ALCAT1過剰発現はまた、ベクター対照と比較して小胞体拡大をもたらしたが(図1D、拡大図1F)、このことは以前報告されたALCAT1のミトコンドリア関連の膜(MAM)での局在に符合する。

【0198】

ミトコンドリア分裂はしばしばmtDNAの不安定性を伴う：

アブノーマルなミトコンドリア形態を前提として、mtDNAコピー数と変異率を調節するALCAT1の役割がRT-PCR分析により研究された。驚くべきことに、ALCAT1過剰発現はC2C12 A1細胞において有意にmtDNAコピー数を減少させた(図1H)。さらにALCAT1過剰発現は有意にmtDNA変異率を増大させ(図1I)、このことがミトコンドリア質量とmtDNA安定性の調節におけるALCAT1の主要な役割の証明となった。

10

【0199】

ALCAT1消失はミトコンドリア質量とmtDNA忠実性をマウスにおいて増大させる：

ALCAT1ノックアウトマウスを使用してALCAT1欠乏の影響、ミトコンドリア形態、mtDNA質量、およびmtDNA変異率への影響が単離マウス胚性線維芽細胞(MEF)および骨格筋において電子顕微鏡で研究された。C2C12細胞での発見を支持してALCAT1欠乏は培養MEFにおいて有意にミトコンドリア密度を増大させた(図2B、拡大図2D)。ALCAT1消失は前脛骨筋縦断面において有意に筋肉繊維の厚みを増大させ、それはそれぞれミオシンフィラメントとアクチンフィラメントを示す拡大図の暗いAバンドと明るいIバンドにより証明されている(図2F)。この結果はALCAT1欠乏がALCAT1ノックアウトマウスにおいて有意に除脂肪質量を増大させたというデータにより指示された。さらにALCAT1消失は有意にmtDNAコピー数を増大させた(図2G)。驚くべきことに、ALCAT1欠乏はまた、有意にmtDNA忠実性を改善した、それはALCAT1ノックアウトマウスの単離MEFにおける有意に低い変異率により証明された(図2H)。

20

【0200】

MFN2発現の調節におけるALCAT1の中心的役割：

MFN2はミトコンドリアおよび小胞体の形態および繫留に機能性ブリッジとして必要である。MFN2^{-/-}マウスからのマウス胎仔由来線維芽細胞(MEF)は分裂したミトコンドリアおよび拡張した小胞体槽を示し、それらはALCAT1過剰発現に起因する不全に似ている。つぎの疑問はALCAT1過剰発現および不全がMFN2およびミトコンドリア融合プロセスの他の調節因子の発現に繰り返し影響を与えるかであった。図3Aに示すように、ALCAT1過剰発現はC2C12 A1安定細胞系においてベクター対照に比べて70%超のMFN2 mRNAの枯渇、およびMFN1とOPA1 mRNAの両方の50%の減少を引き起こした。逆にALCAT1欠乏は、ALCAT1ノックアウトマウスの単離MEFにおいて、劇的にMFN2 mRNAの転写と、同時にMFN1 mRNAレベルの有意な増大を示した(図3B)。しかしALCAT1欠乏はミトコンドリア内膜の融合に必要なOPA1のmRNA発現に対し、なにも影響を及ぼさなかった。

30

40

【0201】

減少したmRNAレベルと符合して、3つのタンパク質全ての発現もまたALCAT1過剰発現により有意に下方制御された。詳細には、MFN2はベクター対照と比較して74.6%の劇的な減少を示し、次にMFN1(38.0%)、OPA1(12%)であった(図3C)。逆にMFN2タンパク質レベルはALCAT1ノックアウトマウスの単離MEFにおいて、600%超上方制御された(図3D、定量分析図3E)。ALCAT1欠乏はまたMFN1およびプロヒピチン、ミトコンドリアの最適形態および呼吸に必要なミトコンドリア膜シャペロンタンパク質の発現を有意に増大させた。対照的にALCAT1欠乏はOPA1またはカルネキシン、小胞体内に存在するタンパク質に影響を与えな

50

った(図3E)。

【0202】

A L C A T 1はM F N 2枯渇を通じてミトコンドリア融合を損なう：

A L C A T 1がM F N 2を枯渇させ、ミトコンドリア分裂を引き起こすことの発見は、ミトコンドリア融合を調節するA L C A T 1の役割に関する研究を促進させた。ミトコンドリアマトリックス標的E G F P (m t E G F P)または赤色蛍光タンパク質(m t R F P)が個別にC 2 C 1 2 - A 1およびC 2 C 1 2 - V 2細胞に形質移入され、その後E G F PとR F Pの重複測定による共焦点顕微鏡を使用した融合分析が行われた。図4A - 4Cに示すように、ベクター対照C 2 C 1 2細胞内のミトコンドリアは正常なミトコンドリア融合を示し、それは図4C(拡大図4D)の統合図において完全な融合を証明する黄色により証明された。対照的にC 2 C 1 2細胞内のA L C A T 1過剰発現は重大な融合不全をひき起こし(図4E - 4H)、それは図4Gの統合画像(拡大図4H)におけるよく分離した緑色と赤色により証明された。融合不全におけるM F N 2欠乏の原因となる役割を直接サポートするため、C 2 C 1 2 - A 1細胞におけるM F N 2の一時的発現が融合不全を完全に救済した、それは統合図4K(拡大図4L)における黄色により証明される。M F N 2発現はまたミトコンドリアのスーパー融合を引き起こした、それはM F N 2を過剰発現するC 2 C 1 2 - A細胞における厚いミトコンドリア管状ネットワーク(図4I - 4K)により証明された。

10

【0203】

M N F 1 / 2が、しかしO P A 1は違うが、A L C A T 1起因のミトコンドリア分裂を救済する：

20

M N F 2はA L C A T 1起因の融合不全を救済できるため、M F N 1やO P A 1のようなダイナミン関連ファミリーの他のメンバーが、C 2 C 1 2 - A 1細胞内にミトコンドリアネットワークを回復することにより、融合不全を救済できるかが疑問となった。上記のように、A L C A T 1過剰発現は、ベクター対照(図5A、5B)と比較した場合に、C 2 C 1 2 - A 1細胞においてミトコンドリア分裂を引き起こした(図5C、5D)。対照的にC 2 C 1 2 - A 1細胞における一時的M F N 1発現はほとんど完全に融合不全を救済した、それは管状ミトコンドリアの回復によって示されている(図5E、5F)。繰り返すが、M F N 2の一時的発現は融合不全を完全に救済し、ミトコンドリアのスーパー融合をもたらした(図5G、5H)。

30

【0204】

対照的にO P A 1の一時的発現はどの融合不全をも救済しなかった(図5I、5J)。このことはA L C A T 1欠乏がM E F内でO P A 1の発現に何の影響も与えなかったこと(図3B、3E)と符合する。この結果は、A L C A T 1媒介融合不全がA L C A T 1が局在するミトコンドリア外膜に限定されることを証明する。

【0205】

M F N 2はA L C A T 1過剰発現起因のミトコンドリア呼吸不全を救済する：

次にC 2 C 1 2 - A 1細胞においてM E N 2発現がまたミトコンドリア呼吸機能を回復できるかが研究された。A L C A T 1はミトコンドリアのプロトン漏出を増大させることによりミトコンドリアの機能不全をひき起こす。プロトン漏出に対するM F N 2の役割がC 2 C 1 2 - A 1細胞において異なるミトコンドリア阻害剤による処置に応答した酸素消費速度(O C R)を分析することによって調査された。S e a h o r s e E x t r a c e l l u l a r F l u x (X F - 2 4)分析器を使用して、A L C A T 1過剰発現が有意にミトコンドリア最大容量を低下させたことが示され、それはミトコンドリア脱共役剤のF C C Pによる処置に応答したO C Rの減少により示された(図6A)。M F N 2の一時的発現、しかしE G F Pベクター対照ではない、がミトコンドリア呼吸能力を完全に回復し、それはベクター対照と比較したO C Rの回復により証明された(図6A)。活性酸素種(R O S)生成の主要サイトとしての呼吸鎖複合体Iと符合して、A L C A T 1過剰発現は、呼吸鎖複合体I阻害薬(N A D H C o Q I 還元酵素)ロテノンでの処置に回答して有意にO C Rを増大させた、これはミトコンドリアのプロトン漏出の証拠を提供し

40

50

た。M F N 2 欠乏が酸化ストレスにおいて原因となる役割を果たすことのサポートとして、C 2 C 1 2 - A 1 細胞においてM N F 2 の一時的発現が完全にO C R を正常化させた（図 6 B）。さらにA L C A T 1 過剰発現がまたミトコンドリアのアデノシン三リン酸分解酵素（A T P a s e）阻害薬のオリゴマイシンでの処置に应答して有意にO C R を増大させた、このことはさらにプロトン漏出を示唆した。M N F 2 の一時的発現により不全はまた完全に正常化した（図 6 D）。対照的に、A L C A T 1 発現もM F N 2 発現も、呼吸鎖複合体 I I I 阻害薬であるアンチマイシンでの処置に应答して複合体 I I I からのO C R に何の影響も及ぼさなかった。

【 0 2 0 6 】

A L C A T 1 が酸化ストレスをミトコンドリア分裂とM F N 2 欠乏にリンクさせる：

酸化ストレスからのミトコンドリア融合不全はミトコンドリア透過性転位孔を開けることによりミトコンドリア膨化を引き起こす。損傷したミトコンドリアはしばしばより多くの活性酸素種（R O S）を生成し、それがさらにミトコンドリア機能不全を悪化させ、悪循環に至る。A L C A T 1 によるカルジオリピン（C L）再構築は酸化ストレスを引き起こすため、A L C A T 1 がその悪循環のなかである役割を果たすのかが疑問となり、それはA L C A T 1 ノックアウトマウスおよび対照マウスからの単離M E F においてテストされた。図 7 A（拡大図 7 C）に示すように、対照マウスからのM E F はH₂O₂での処置に应答して激しいミトコンドリア膨化を示し、それは増大したミトコンドリアと損傷したクリステにより証明された。A L C A T 1 過剰発現は、ベクター対照に比べて最大のA L C A T 1 発現を示すC 2 C 1 2 安定細胞系の1つにおいて激しいミトコンドリア膨化を引き起こした（図 1 0）。この極端な特性のため、このC 2 C 1 2 細胞系は本発明の研究には使用されなかった。対照的にA L C A T 1 欠乏は、単離M E F においてH₂O₂での処置に应答したミトコンドリア膨化（図 7 B、拡大図 7 D）およびミトコンドリア分裂（図 9 A - 9 D）を完全に阻害した。

【 0 2 0 7 】

酸化ストレスの主要原因としてのA L C A T 1 によるカルジオリピン（C L）再構築をサポートするものとして、A L C A T 1 過剰発現はC 2 C 1 2 細胞において脂肪の過酸化を有意に増大させ、それはH₂O₂での処置により用量に依存して激化し、それは脂質の過酸化生成物であるメチレンジオキシアンフェタミン（M D A）の増大したレベルにより示された（図 7 E）。ミトコンドリアは、活性酸素種（R O S）生成の同時発生的増加と共に速い分裂を行う。次の疑問はA L C A T 1 が活性酸素種（R O S）生成を介してM F N 2 欠乏を引き起こすかであった。C 2 C 1 2 - A 1 細胞とベクター対照が図 7 E で使用されたH₂O₂の増大する用量で処置され、その後M E N 2 発現の分析がウェスタンブロット法により行われた。図 7 F に示すように、H₂O₂はベクター対照細胞において用量依存的にM F N 1 とM F N 2 発現を枯渇させた。この処置はさらにA L C A T 1 のM F N 1 とM F N 2 枯渇に対する影響を激化させ、C 2 C 1 2 - A 1 細胞においてM F N 2 発現が完全に失われた。最後にM F N 枯渇の主要原因としてのA L C A T 1 による酸化ストレスを直接サポートするものとして、抗酸化剤の（D P I）によるC 2 C 1 2 - A 1 細胞のブレインキューベーションは、図 7 F に使用されたH₂O₂での同一の処置に应答したM F N 発現の消失を用量に依存して阻害した（図 7 G）。

【 0 2 0 8 】

（議論）

【 0 2 0 9 】

ミトコンドリアが融合イベントを経験すると動的なネットワークが形成され、それは開与ミトコンドリアの区画を連続したものにさせる。融合イベントは各ネットワークの構成員が溶質、代謝生成物、およびタンパク質を共有できるようにする。結果的にこのようなネットワークの破壊は酸化ストレスとミトコンドリア分裂を引き起こし、それは加齢と加齢関連疾病の原因として関連付けられてきた。しかし、根底にあるメカニズムについてはほとんど知られていない。本発明の研究は通常加齢関連代謝疾病を伴う酸化ストレスおよびミトコンドリア分裂を調節するA L C A T 1 の役割を調査した。ミトコンドリア生合成

とmtDNA忠実性の調節におけるALCAT1の最重要な役割が初めて示された。したがって、ALCAT1の過剰発現はミトコンドリア融合を激しく損ない、ミトコンドリア分裂とmtDNA枯渇につながる。逆にマウスにおけるALCAT1の標的化不活化は、有意にミトコンドリア質量を増大させ、そして活性酸素種(ROS)誘導膨化および分裂からミトコンドリアを保護する。驚くべきことに、mtDNAの忠実度を調節するALCAT1の役割が示されが、それはミトコンドリア融合がmtDNA忠実度を守る必要があるという従来の研究(Chen氏他、2010、Cell 141(2):280-289)により実証された。

【0210】

ミトコンドリア融合におけるALCAT1の役割のサポートとして、本研究はMFN2をALCAT1媒介ミトコンドリア機能不全の下流ターゲットとして識別した。MFN2は哺乳類においてミトコンドリア融合、小胞体との繫留、エネルギー代謝、そしてmtDNA忠実性に必要とされる(Chen氏他、2010、Cell 141(2):280-289; de Brito OM & Scorrano L (2008), Nature 456:605-610)。ALCAT1の過剰発現はC2C12細胞において激しくMFN2発現を枯渇させたが、一方ALCAT1欠乏はALCAT1ノックアウトマウス(KO)から単離されたMEF細胞において劇的にMFN2発現を増大させた。対照的にALCAT1欠乏は、ミトコンドリア内膜の融合に必要なOPA1の発現に何の影響も及ぼさなかった。この結果は、ALCAT1は、ALCAT1が局在するミトコンドリア外膜の融合に関してのみ影響を与える(Li J他著、Cell Metab 12(2):154-165, 2010)ことについて証拠を提供し、このことはさらに25%のカルジオリピン(CL)が活性CL再構築が行われる外膜に局在するという従来のレポート(Gebert N氏他著(2009)Curr Biol 19(24):2133-2139)により実証されている。

ALCAT1媒介融合欠陥の下流ターゲットとしてのMFN2に符合して、マウスにおける標的化MFN2不活化はALCAT1過剰発現を思わせる多重のミトコンドリア欠陥をひき起こし、それらにはmtDNAの高変異率、mtDNA枯渇、分裂ミトコンドリア、およびミトコンドリアと小胞体の繫留の重度な遺失を含む。MFN2欠乏はまた骨格筋萎縮症を引き起こし、それはALCAT1欠乏がALCAT1ノックアウトマウスにおいて有意に骨格重量を増大させたという発見に符合する(Li J他著(2010)、Cell Metab 12(2):154-165; Chen氏他、2010、Cell 141(2):280-289)。ALCAT1の下流ターゲットとしてのMFN2の直接的サポートとして、ALCAT1起因の融合欠陥がMFN1またはMFN2の発現により、しかしOPA1ではなく、救済可能である。さらにMFN2の発現はまた、ミトコンドリア呼吸能力を回復し、C2C12細胞においてALCAT1過剰発現に起因するプロトン漏出を阻害した。これらの結果はMFN2欠乏が有意にプロトン漏出を増大させ(Bach D氏他著(2003)J Biol Chem 278(19):17190-17197)、一方MFN2過剰発現は高血糖症誘発活性酸素種(ROS)生成を阻害する(Yu T, Robotham JL, & Yoon Y (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(8):2653-2658)という観察と符合した。

【0211】

ミトコンドリア分裂/融合機構は、高血糖症関連疾病において急性および慢性の活性酸素種(ROS)生成を制御する(Yu T, Robotham JL, & Yoon Y (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(8):2653-2658)。ミトコンドリアは、酸化ストレスに応答して、速い分裂と同時に活性酸素種(ROS)生成を増大させるが、これは分裂の阻害または融合プロセスの刺激により緩和される。本発明の研究により、ALCAT1が代謝疾病においてミトコンドリア融合欠陥と活性酸素種(ROS)生成との間のミッシングリンクであることがわかった。第一に、ALCAT1によるカルジオリピン(CL)再構築が有意にCL内のDHA含有量を増

10

20

30

40

50

大させ、それがプロトン漏出と酸化ストレスに繋がった。哺乳類において、ミトコンドリア膜のDHA含有量は寿命と逆相関し、そしてROS生成および脂質過酸化インデックスと正相関する。従って加齢および加齢関連疾病における、脂質過酸化インデックスを増大させるカルジオリピン(CL)内の増大したDHA含有量は、ミトコンドリア機能不全と関連付けられてきた(Han X他著(2007) *Biochemistry* 46(21): 6417-6428; Sparagna GC & Lesnfsky EJ(2009) *J Cardiovasc Pharmacol* 53(4): 290-301; Lee H-J, (2006) *Lipids Health & Dis*. 5: 2; Paradies G他著、(2010) *Free Radic Biol Med* 48(10): 1286-1295; Shi Y(2010) *J Biomed Res* 24(1): 6-15)。第二に、ALCAT1過剰発現は激しい脂質過酸化をC2C12細胞において引き起こし、それは酸化ストレスによりさらに激化した。最後に、融合不全の主要原因としてのALCAT1による酸化ストレスの直接的サポートとして、ALCAT1過剰発現が有意にMFN2発現を枯渇させた、それはC2C12細胞を抗酸化薬で事前処置することにより緩和できる。総括すると、図7Hに示すように、加齢関連疾病において、MFN2の枯渇化を介してROS生成をミトコンドリア分裂に結び付けることに関するALCAT1の重要な役割をこれらの発見が支持している。

10

【0212】

ミトコンドリア融合におけるALCAT1の調節的役割もさらに、CL代謝に関係するミトコンドリアホスホリパーゼD(Mit oPLD)に関する最近の研究(Chio S Y氏他著(2006) *Nat Cell Biol* 8(11): 1255-1262)により理解される。Mit o-PLDはミトコンドリア外膜に局在し、そこでCLの加水分解を触媒し、ミトコンドリア融合に必要なホスファチジン酸、融合性脂質を生成する。驚くべきことに、Mit o-PLD欠乏は融合不全およびミトコンドリア分裂を含むミトコンドリア機能不全をもたらし、それはALCAT1過剰発現によるものを連想させる。しかし基底にあるメカニズムには有意の相違点がある。例えば、Mit o-PLDはMFN2の下流で機能し、そしてMit o-PLD発現はマイトフュージン(MFN)欠乏に起因する融合不全を救済することができる。さらに、ALCAT1と対照的にMFN1とMFN2のタンパク質発現レベルはMit o-PLD過剰発現または欠乏により変化されない。さらにまた、Mit o-PLD過剰発現はスーパー融合と同時にマイルドなカルジオリピン(CL)欠乏を引き起こす。最後に、Mit o-PLDは最近になってマウスにおけるpiRNA安定性および雄性不妊を調節する役割が発表されている(Huang H氏他著(2011) *Dev Cell* 20(3): 376-387)。ここに記載される発見は、ALCAT1によるCL再構築はホスファチジン酸生成と無関係にミトコンドリア融合を調節することを証明する。

20

30

【0213】

加齢と加齢関連疾病の発症は酸化ストレスおよび増大したmtDNA変異率を伴い、それらは加齢と加齢関連疾病の主たる要因であると言われてきた。また、MFN2欠乏は加齢関連代謝疾病と関連付けられてきた。重要なことに、本研究がmtDNA忠実性とMFN2発現の制御におけるALCAT1の役割を同定した。ここに記載される発見は加齢と加齢関連疾病の発症の基礎となる分子メカニズムを解明する将来の研究において重要な関連を持つであろう。加齢と加齢関連疾病の発症におけるALCAT1の役割のサポートとして、ALCAT1発現は酸化ストレスによりまた加齢関連代謝疾病の発症により上方調節される。ALCAT1の標的化不活化は、肥満とそれに関連するミトコンドリア機能不全を阻害する。従って、ALCAT1に対する化学的阻害薬の開発が加齢と加齢関連疾病の潜在的治療方法を将来提供することが想像できる。

40

【0214】

(実施例2: ALCAT1によるカルジオリピン再構築が酸化ストレスおよびマイトファジーへの影響を介して心筋症を調節する)

酸化ストレスおよびミトコンドリア機能不全の齧歯(げつし)動物モデルとしての甲状

50

腺機能亢進症を患うマウスを使用して、本研究は甲状腺機能亢進症を併発する心筋症におけるALCAT1の役割を調査した。その結果は、酸化ストレスおよびミトファジーを介した甲状腺ホルモン誘発心肥大におけるALCAT1の重要な役割を初めて示した。

【0215】

(材料と方法)

【0216】

試験薬：

本研究に使用された抗体はphospho-AKT(Thr308)、AKT、Phospho-S6K1、phospho-S6(Ser240/244)、S6、phospho-4E^BP1(Thr37/46)、4E-BP1に対するポリクローナル抗体を含み、それらすべてはCell Signaling Technology社(Danvers, MA)から購入した。抗LC3抗体はNovus Biologicalsより、抗p62抗体はAmerican Research Products Inc(Belmont, MA)から購入した。PINK1ポリクローナル抗体(A01)はAbnova社より購入した。ロバ抗ラビットIgG西洋わさびペルオキシダーゼ結合抗体はGE Healthcare(Piscataway, NJ)より購入した。L-チロキシン(T4)および3,3',5-トリヨード-L-チロニン ナトリウム塩(T3)はSigmaから購入した。

【0217】

H9c2安定細胞系の生成：

H9c2細胞が安定的にFLAG-タグ付きのALCAT1発現ベクターまたは対照としての空ベクターを形質移入された。安定的な形質移入体はG418(1mg/ml)によりスクリーンされ、そして10%熱不活化ウシ胎児血清(FCS)、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えられたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Gibco社より)で、95%空気5%CO₂、温度37℃で培養された。

【0218】

動物飼育：

ALCAT1遺伝子をターゲットとして遺伝子欠失したマウスが前述のとおり(Li氏他著、Cell Metab 12(2):154-165, 2010)生成された。甲状腺機能亢進性心筋症の誘発のため、雄のALCAT1ノックアウトマウスと野生型(WT)マウスが2つのグループに分けられた。1つのグループは0.01N NaOHと0.9%NaClの溶媒内の甲状腺ホルモンで2日間または4週間処置された(レボチロキシン、Sigma CAS 51-48-9, 1mg/kg体重を毎日腹腔内注射により投与)。マウスの対照グループは同一の溶媒を同一の期間注入された。すべての動物には環境的に施設内で、昼行性日照、自由な水へのアクセスのもと、食餌は標準的な齧歯動物用食餌(ウィスコンシン州、マジソン、Harland Teklad 2018)与えた。動物に関係する全ての実験は認可された機関の動物飼育に従い、かつ国立衛生研究所(NIH)ガイドライン(NIH出版番号86-23、1985)に準拠したプロトコルを使用した。

【0219】

心エコー検査：

4週間の甲状腺ホルモン処置の後、マウスはナトリウム・ペントバルビタールの腹腔内注射により軽く麻酔をかけられた(75μg/g体重)。経胸腔心エコー検査が14MHz線形変換器を備えるアキューソンセコイアモデル512心エコーシステムを使用して行われた(シーメンス、Malvern, PA)。以下のパラメータが測定された：(心)拡張期の最後での心室間隔壁の厚み(IVSD)、左心室の拡張終(末)期寸法(LVEDD)、拡張期の最後での後壁の厚み(LVPWD)。

【0220】

定量PCR分析：

定量PCR分析が前述の通り(Li J他著(2010)、Cell Metab 1

10

20

30

40

50

2 (2) : 1 5 4 - 1 6 5) 実施された。ベクターとALCAT1過剰発現H9c2細胞内のミトコンドリアコピー数の分析が、ミトコンドリアコード化NADH脱水素酵素1 (ND 1) をmtDNAマーカーとして、そしてシクロフィリンAを遺伝子マーカーとして使用して実施された。H9c2細胞は0.1, 0.25, 0.5 mMのH₂O₂で2時間事前処理され、その後RT-PCR分析がND1に対するプライマー対 (フォワード : 5 - TGACCCATAGCCATAATATGATTT - 3 (SEQ ID NO : 1) とリバーズ : 5 - TTCTACGTTAAACCCCTGATACTAA - 3 (SEQ ID NO : 2))、およびシクロフィリンA (フォワード : 5 - ACACGC CATAATGGCACTCC - 3 (SEQ ID NO : 3) とリバーズ : 5 - CAGTCTTGGCAGTGCAGAT - 3 (SEQ ID NO : 4)) を使用して実施された。バイオマーカーの定量PCR分析が、MHCに対するプライマー対 (フォワード : 5 - AGGGCGACCTCAACGAGAT - 3 (SEQ ID NO : 5) とリバーズ : 5 - CAGCAGACTCTGGAGGCTCTT - 3 (SEQ ID NO : 6))、BNP (フォワード : 5 - GCTGCTTTGGGCACAA GATAG - 3 (SEQ ID NO : 7) とリバーズ : 5 - GGAGCTCTTC CTACAACA ACTT - 3 (SEQ ID NO : 8))、ANP (フォワード : 5 - GTGTACAGTGC GG TGTCCA A - 3 (SEQ ID NO : 9) とリバーズ : 5 - ACCTCATCTTCTACCGGATC - 3 (SEQ ID NO : 10))、ACTA1 (フォワード : 5 - GTTCGCGCTCTCTCTCCT CA - 3 (SEQ ID NO : 11) とリバーズ : 5 - GCAACCACAGCA CGATTGTC - 3 (SEQ ID NO : 12))、コラーゲンI (フォワード : 5 - GAGCGGAGAGTACTGGATCG - 3 (SEQ ID NO : 13) とリバーズ : 5 - GTTCGGGCTGATGTACCAAGT - 3 (SEQ ID NO : 14))、コラーゲンIII (フォワード : 5 - ACCAAAAGGTGATG CTGGAC - 3 (SEQ ID NO : 15) とリバーズ : 5 - GACCTCGT GCTCCACTTAGC - 3 (SEQ ID NO : 16))、およびGAPDH (フォワード : 5 - AATGGTGAAGGTCGGTGTG - 3 (SEQ ID NO : 17) とリバーズ : 5 - GTGGAGTCACTGGAACATGTAG - 3 (SEQ ID NO : 18)) を使用して実施された。

10

20

30

【0221】

脂質過酸化検定法 :

心室組織内の脂質過酸化物およびH9c2細胞がTBARSキット (Cayman Chemical Company, Cat No. 10009055) をメーカーの指示通り使用してチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) のレベルを測定することにより定量化された。

【0222】

活性酸素種 (ROS) 測定 :

ミトコンドリアからの細胞内活性酸素種 (ROS) 生成が定量的に過酸化水素 (H₂O₂) を測定することにより間接的に検知された。

【0223】

ミトコンドリアの電子顕微鏡 (EM) 分析 :

マウス心筋細胞のミトコンドリアの超微細構造が電子顕微鏡写真を使用して評価された。心臓サンプルが各グループの3匹のマウスからの左心室の同じ場所において採取された。左心室の一部は0.05%のCaCl₂を含む0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 内の5%グルタルアルデヒドと4%パラホルムアルデヒドで24時間固定された。0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液で洗浄後、組織は1%OsO₄および0.1Mカコジル酸緩衝液を一晩添加され、脱水され、そしてEmbed 812に埋め込まれた。切片は2%酢酸ウラニルで、次に0.4%クエン酸鉛で染色され、Philips 400電子顕微鏡で観察された。

40

【0224】

50

統計的分析：

データは平均 ± S E Mで表示された。統計的比較が、2つのH9c2細胞系の間およびALCAT1ノックアウトと野生型マウスとの間の差異を測定するため両側非対t検定を使用して行われた。より多くのグループ間の比較には、変異の一方分析が使用され、統計的有意性は $p < 0.05$ において認められた。

【0225】

結果

【0226】

ALCAT1は心臓脂質過酸化およびmtDNA生合成を調節する：

心臓におけるALCAT1発現は酸化ストレスにより、また甲状腺機能亢進心筋症の発症により上方制御（発現増加）される。本願の研究はALCAT1異常発現が心筋症の発症において原因となる役割を果たすことを示している。第一に、H9c2心臓細胞系におけるALCAT1過剰発現の細胞形態およびミトコンドリア機能に対する役割が調査された。そのためH9c2心臓細胞系が安定的にフラッグ付きのALCAT1cDNA（ALCAT1）が形質移入され、またはベクター対照が生成された。安定的H9c2心臓細胞系におけるALCAT1のmRNA発現レベルはベクター対照に比べて3倍だけ高かった。それは単離された心筋細胞における上方制御された酸化ストレス誘発内在性ALCAT1レベルに似ている（Li J他著（2010）、Cell Metab 12（2）：154-165）。これら2つの安定的H9c2細胞系を細胞ベースモデルとして使用し、脂質過酸化およびmtDNAコピー数に対するALCAT1の影響が第一に分析された。図11Aに示すように、ベクター対照に比べて、ALCAT1過剰発現は脂質過酸化の副産物であるチオバルビツール酸反応性物質（TBARS）の細胞内レベルを有意に増加させた。TBARSの生成は H_2O_2 による処置に反応して激化し、このことは心筋症の酸化ストレスにおけるALCAT1の原因となる役割を実証した。

【0227】

ミトコンドリア活性酸素種（ROS）放出に対するALCAT1の直接的影響を解明するため、ミトコンドリア活性酸素種（ROS）生成速度がALCAT1発現H9c2細胞系とベクター対照においてプロファイルされた。H9c2細胞から単離された単離ミトコンドリアにおける検定開始から固定時点での H_2O_2 生成速度が分析された。結果はALCAT1過剰発現が相対的活性酸素種（ROS）生成速度を有意に3.77倍（ $P < 0.01$ ）増加させた（図11B）。酸化ストレスはmtDNAの不安定性を引き起こし、そのことは加齢関連代謝疾病におけるミトコンドリア機能不全に関係があるとされてきた。ALCAT1が酸化ストレスの主たる源であることの更なるサポートとして、H9c2細胞において増加用量の H_2O_2 処置に反応してALCAT1過剰発現がmtDNA枯渇をもたらした（図11C）。またALCAT1過剰発現はまたH9c2細胞の肥大性成長を引き起こした（図18A）。さらに、ALCAT1過剰発現はH9c2細胞の心筋細胞への欠陥的分化を引き起こした（図11E, 11F）。このことは分化H9c2細胞の主要インジケータであるミオゲニン発現の欠如により実証された（図18B）。

【0228】

甲状腺機能亢進症は酸化ストレスおよび脂質過酸化を引き起こす。ALCAT1ノックアウトマウスを使用して、心筋症の発症に伴う症状においてALCAT1欠乏が心臓の脂質過酸化に果たす影響を分析した。報告済みの甲状腺機能亢進症の酸化ストレスに対する影響と合致して、甲状腺機能亢進症は有意に心臓における脂質過酸化レベルを増加させた（図11D）。対照的にALCAT1の標的不活化は完全に甲状腺機能亢進心筋症の発症に反応した心臓脂質過酸化を防止した。このことはさらに心筋症に伴う酸化ストレスにおけるALCAT1の原因となる役割を確認した。

【0229】

ALCAT1の標的不活化は甲状腺機能亢進心筋症を防止する：

酸化ストレスおよびミトコンドリア機能不全は心筋症に関連付けられてきた。次にノックアウトマウスを使用して甲状腺機能亢進心筋症の発症におけるALCAT1の役割が調

査された。急性または慢性甲状腺機能亢進症の心臓肥大に伴う心機能、ミトコンドリア機能不全および信号経路に対する影響を観察するため、ALCAT1ノックアウトマウスおよび野生型(WT)マウスが甲状腺ホルモン(T4)で2または28日連続して処置された。心機能は末期慢性処置において実施される心エコー検査により評価された。溶媒グループの中では、ALCAT1ノックアウトマウスおよび野生型(WT)マウスの間に心臓形態および、心室中隔欠損症(IVSD)、左室拡張末期径(LVEDD)および左室後壁寸法(LVPRWD)を含む心エコー検査パラメータに関して有意の差異は見られなかった。この結果はALCAT1が心臓の成長または正常な心機能には必要でないことを証明する(図12A-12E)。しかし、4週間のT4処置後に野生型(WT)マウスに心臓肥大が発生した、これは心臓重量対体重比における明白な増加(図12B)、IVSD(図12C)、LVEDD(図12D)およびLVPRWD(図12E)により実証されている。対照的に、ALCAT1欠乏はT4誘発心肥大およびそれに関連する心エコー検査パラメータの変化を防止した。この結果は甲状腺機能亢進症に誘発された心筋症の発症に上方制御されたALCAT1発現が貢献することを証明する。

10

【0230】

ALCAT1の消失は、T4が誘発した心筋細胞の肥大生長を緩和する：

心筋肥大症は、生理学および病態生理学的な刺激に対する適応性応答としての高度分化型心筋細胞の増加した寸法により特徴づけられる。ALCAT1の過剰発現がH9c2細胞の肥大型成長を引き起こしたため、次にALCAT1欠乏がT4が誘発した心筋細胞の肥大生長を緩和するか否かが検証された。図13A-13Gに示すように、ALCAT1ノックアウトマウスおよび野生型(WT)マウスの間に甲状腺機能が正常な状態での心筋細胞の大きさに有意の差は見られなかった。肥大生長と合致して、野生型(WT)マウスでは心筋症の発症は有意に心筋細胞の大きさを増加させた(図13B)。対照的に心筋細胞の肥大生長はALCAT1ノックアウトマウスでは甲状腺機能亢進症の野生型(WT)マウスと比較した場合有意に減少した(図13D)。これらの観察結果は心筋細胞の細胞面積(図13E)、直径(図13F)および寸法分布(図13G)の定量分析の結果によりさらに支持された。

20

【0231】

ALCAT1欠乏がT4誘発心室線維症の発症を防止する：

心臓肥大の発生は心筋の構造的再構成を引き起こし、コラーゲンタイプIおよびタイプIIIの過剰蓄積につながる。心室線維症はまた心不全および他の心臓合併症の発症の主要リスク要因である。心筋症の緩和薬としてのALCAT1のさらなる証拠を提供するため、左心室内のコラーゲンタイプIおよびタイプIIIの蓄積を調節するALCAT1の役割を検証した。心臓線維症は野生型(WT)およびノックアウト(KO)マウスからの左心室の切片のマッソン3色染色法により分析された。図14Bに示すように、野生型(WT)マウスの甲状腺ホルモンによる28日間処置は、青色染色の広い領域で示されるように、心筋症の結果として、溶媒対照(図14A)と比較して激しい心室線維症を引き起こした。対照的にALCAT1欠乏は有意に甲状腺機能亢進症に起因する線維症を減少させた(図14D)。このことは再度、甲状腺機能亢進症での心不全に対しALCAT1発現の役割を関連付けた。コラーゲン蓄積の発見と合致して、甲状腺機能亢進症は野生型(WT)マウスにおいて有意にコラーゲンタイプIおよびタイプIIIの両方のmRNA発現を増加させたが、ALCAT1ノックアウト(KO)マウスでは増加させなかった(図14E, 14F)。

30

40

【0232】

ALCAT1欠乏が心筋症に伴うバイオマーカーの発現を正常化する：

甲状腺機能亢進症のような病理学的症状に誘発された遷延性肥大症は最終的に心不全に至り、それは工業国では死の主要原因である。増加した脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は心不全を示す特定の試験である。BNPは心室容積の拡大、圧力過負荷、およびその結果としての心室隔壁応力の増加に反応して心室から特異的に分泌される心臓神経ホルモンである。肥大性心筋症の発症はまた、心房性ナトリウム利尿因子(ANF)、

50

- ミオシン重鎖 (- MHC) および骨格筋アルファアクチン 1 (ACTA1) を含む胎児遺伝子のサブセットの誘発を伴う。心臓肥大の進行における ALCA1 の役割を同定するため、心臓肥大および心不全の特徴の RNA 発現が分析された。遷延性甲状腺機能亢進症は野生型 (WT) マウスにおいて有意に全ての肥大性バイオマーカーの RNA 発現を増加させた (図 15 A - 15 D)。甲状腺機能亢進症はまたノックアウト (KO) マウスにおいてもバイオマーカーの発現を増加させたが、その影響は対照グループと比べて弱められた。対照的に溶媒で処置された場合は、野生型 (WT) マウスと ALCA1 ノックアウト (KO) マウスとの間に有意の差は無く、このことはさらに甲状腺機能亢進心筋症の病因論における ALCA1 の役割を再確認した。

【 0 2 3 3 】

ALCA1 不活化が PINK1 発現を刺激することにより、ミトコンドリア膨化およびマイトファジーを防止する：

マイトファジーとも呼ばれる選択的ミトコンドリア自己貪食は、損傷したミトコンドリアを消滅させることによりミトコンドリアの品質維持に貢献している。マイトファジーはまた、ミトコンドリアの活性酸素種 (ROS) 生成およびミトコンドリア DNA の変異を減少させることによりミトコンドリアの量および質の維持に必須の役割を果たしている。従って心臓に特異的な自己貪食の欠乏は心筋症の原因となる。心室断面の顕微鏡分析を使用して、甲状腺機能亢進心筋症に伴うミトコンドリア機能不全および自己貪食における ALCA1 の役割が検証された。甲状腺機能亢進症における激しい酸化ストレスに合致して、野生型 (WT) マウスでは、甲状腺機能亢進心筋症の発症はミトコンドリア膨化、無秩序なクリステ、および異常なミトコンドリア構造を伴った (図 16 A , 拡大図 16 B)。対照的にこれらのダメージは ALCA1 欠乏により大幅に緩和された (図 16 C , 拡大図 16 D)。損傷されたミトコンドリアへの補償的応答として、野生型 (WT) マウスでは、心臓 LC3、オートファゴソームマーカー、が甲状腺機能亢進症により有意に上方制御された (図 16 E , 拡大図 16 F)。さらに、自己貪食と負の相関がある p62 タンパク質の発現が野生型 (WT) マウスでは有意に低かった。これらの観察結果を支持するものとして、甲状腺機能亢進症の発症に応答した自己貪食ミトコンドリアの数が、野生型 (WT) マウスでは ALCA1 ノックアウト (KO) マウスに比べて有意に高かった (図 20)。

【 0 2 3 4 】

PTEN 誘導推定キナーゼ 1 (PINK1) はセリン/スレオニンタンパク質キナーゼであり、マイトファジーを介して損傷したミトコンドリアを排除することにより、細胞ストレスの間のミトコンドリア機能不全を防ぐ。マウスにおいて PINK1 欠乏は酸化ストレスおよびマイトファジーを引き起こし、心筋症につながる。ミトコンドリア機能不全における ALCA1 の原因となる役割の更なるサポートとして、心臓 PINK1 発現は ALCA1 欠乏により有意に上方制御され、このことは ALCA1 ノックアウト (KO) マウスにおける酸化ストレスとマイトファジーのレベルの減少と合致する (16 E , 定量化図 16 G)。これらの発見は、ALCA1 による酸化ストレスが甲状腺機能亢進心筋症に伴うミトコンドリア機能不全およびマイトファジーにおいて主要な役割を果たすという証拠を提供する。

【 0 2 3 5 】

心筋症において ALCA1 による酸化ストレスが Akt - mTOR 信号伝送経路を調節する：

甲状腺機能亢進症は心筋細胞においてタンパク質合成を刺激することにより心筋症を引き起こす。肥大化成長における ALCA1 の役割の基礎となる分子メカニズムを同定するため、ALCA1 の過剰出現と欠乏の、Akt, Erk, S6K および 4E - BP1 のリン酸化を含む細胞成長と増殖にかかわる信号伝送経路に対する影響が H9c2 細胞において、そして甲状腺機能亢進症のマウスにおいて分析された。増加した活性酸素種 (ROS) レベルはインシュリン抵抗性につながり、それは心不全において原因となる役割を果たす。図 17 A に示すようにベクター対照において、H9c2 細胞のインシュリン処置

10

20

30

40

50

は用量に依存してAktタンパク質と細胞外シグナル制御キナーゼ(Erk)のリン酸化を刺激した。対照的にALCAT1過剰発現はErkリン酸化の消失と同時にインシュリン刺激Aktリン酸化を有意に減少させ、このことは激しいインシュリン抵抗性の証拠を提供した(図17A)。

さらにALCAT1による慢性酸化ストレスもまたH9c2細胞においてT3-誘発Akt, S6Kおよび4E-BP信号経路の活性を完全に防止した(図17B)。ALCAT1過剰発現に起因するH9c2細胞の肥大生長と合致して、S6Kおよび4E-BPの基礎リン酸化はALCAT1発現H9c2細胞において有意に高かった。H9c2細胞における発見のサポートとして、マウスに対する甲状腺ホルモンによる短期処置は、ALCAT1ノックアウト(KO)マウスと野生型(WT)マウスの両方において、心臓Akt-mTORリン酸化を刺激した(図20)。しかし、慢性甲状腺機能亢進症は心筋症の発症によりAkt-mTOR信号経路の有意な下方制御を引き起こし、それはAktと4E-BPの有意に低いリン酸化により実証された(図17C)。甲状腺機能亢進症もまたGsk3、その欠乏は心筋症を引き起こすが、のリン酸化を下方制御した。心臓肥大の不存在と合致して、ALCAT1不足は、慢性甲状腺機能亢進症により誘発されたこれらシグナルタンパク質のリン酸化の下方制御を完全に防止した。

【0236】

議論

【0237】

カルジオリピン(CL)再構築は、酸化リン酸化からの永続的な高エネルギー要求を持つ組織である心臓の機能の調節において重要な役割を果たしている。カルジオリピン(CL)の生物学的機能はその脂肪アシル鎖の構造により決定される。心臓では機能的カルジオリピン(CL)はリノール酸を加えられ、それはミトコンドリア酵素やタンパク質の活性をサポートするため重要である(Claypool SM & Koehler CM. Trends Biochem Sci. 2012 Jan; 37(1): 32-41)。従ってTLCL、心臓内のシグネチャ・カルジオリピン(CL)の喪失は、生理学的再構築の結果として、心筋症および心不全の原因と関連付けられてきた。しかし心臓疾病においてカルジオリピン(CL)の生理学的再構築に関わる酵素は検出できていない。ALCAT1はカルジオリピン(CL)の有害な再構築を触媒し、異常カルジオリピン(CL)種の生成に至るリゾカルジオリピン・アシル転位酵素である(Li J他著(2010)、Cell Metab 12(2): 154-165)。ALCAT1を安定して発現するH9c2心臓細胞とALCAT1遺伝子を標的不活化されたマウスを使用して、本研究では甲状腺機能亢進症に起因する心筋症の発生におけるALCAT1過剰発現と欠乏の役割が調査された。

【0238】

甲状腺機能亢進症は有意に酸化ストレスを増加させる、それはカルジオリピン(CL)過酸化および心不全の原因となることが知られている(Drummond GR他著、(2011) Nat Rev Drug Discov 10(6): 453-471; Lesniewsky EJ他著、(2004) Am J Physiol - Heart & Circ Physiol 287(1): H258-267)。加齢関連疾病における生理学的カルジオリピン(CL)再構築は、カルジオリピン(CL)内のDHA含有量の富化を介して活性酸素種(ROS)生成を激化させると信じられている。この仮説のサポートとして、カルジオリピン(CL)内のDHA含有量が有意に脂質過酸化インデックス増加させ、このことは加齢および加齢関連疾病においてミトコンドリア機能不全と関係づけられてきた。したがって、加齢の始まりは心臓TLCLの欠乏と同時にカルジオリピン(CL)内のDHAの富化を伴う。従って、ミトコンドリア膜DHA含有量は寿命と負の相関があり、活性酸素種(ROS)生成および脂質過酸化インデックスと正の相関がある。したがって、増加したDHA含有量とカルジオリピン(CL)過酸化は、甲状腺機能亢進症における心臓異常、糖尿病、虚血再灌流障害、および心不全に伴う共通の欠陥として識別されてきた。ALCAT1がT4-誘発心筋症において酸化ストレスの主要な媒介物質で

10

20

30

40

50

あることのサポートとして、ALCAT1によるカルジオリピン(CL)再構築はカルジオリピン(CL)内のDHA含有量を増加させ、一方ALCAT1の標的欠失はALCAT1ノックアウト(KO)マウスにおいて心臓TLCLレベルを増加させる。これらの発見と合致して、本研究からの結果は、ALCAT1過剰発現がH9c2心臓細胞系において激しい酸化ストレス、脂質過酸化、およびmtDNA欠失を引き起こし、心臓管状筋細胞への障害性分化をもたらした。ALCAT1が甲状腺機能亢進症における酸化ストレスの主要媒介物質であることの直接的サポートとしてALCAT1発現の消失が甲状腺機能亢進症に起因する心臓脂質過酸化を完全に防止した。

【0239】

ミトファジーは酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全および加齢に対する標的防御である。ヒトおよび齧歯(げつし)動物において心臓ミトファジーは心臓肥大および心不全の発症により上方制御される。自己貪食の欠失はイースト菌において激しい酸化ストレスを、マウスにおいて心筋症の原因となる。PTEN誘導推定キナーゼ、PINK1タンパク質(PINK1)はミトファジーの主要調節因子であり、変異するとパーキンソン病の原因となる。PINK1はまた正常な心臓機能において必須の役割を果たす。PINK1はミトファジーの調節を介した損傷ミトコンドリアの除去を促進することにより、ミトコンドリア機能不全および酸化ストレスを防ぐ。従って、PINK1発現はヒト末期心不全において下方制御され、一方マウスにおけるPINK1欠乏は酸化ストレス、ミトファジーおよび心筋症の原因となる。ALCAT1が心筋症の生理学的発生において原因となる役割を果たすことの更なるサポートとして、本研究はALCAT1が心臓におけるミトファジーとPINK1発現の主要調節因子であることを識別した。心筋症の発症が劇的にミトファジーミトコンドリアの数を増加させたことが実証され、このことはLC3およびp62タンパク質発現を含む自己貪食バイオマーカーの変化によりサポートされた。対照的に、ALCAT1の欠失は甲状腺機能亢進心筋症に伴う酸化ダメージからミトコンドリアを保護した。ALCAT1欠乏もまたp62タンパク質発現の増加と同時にLC3発現を有意に下方制御した。

驚くべきことに、ALCAT1欠乏は劇的にPINK1発現を増加させ、このことはPINK1の酸化ストレスおよび心筋症に対する防御的役割と合致した。これらの発見は、パーズ症候群においてTLCL欠乏の原因となるTAZ遺伝子を標的欠失されたマウスにおいて、ミトファジーおよび心筋症のレベルが増加したことによりさらにサポートされた。

【0240】

心筋症発症は心筋細胞においてAkt-mTORおよびErk経路を活性化することによりタンパク質合成を刺激する。Akt信号経路の活性化は細胞を酸化ストレス誘発アポトーシスから保護するが、一方mTOR活性化は心筋症の肥大生長に必要とされる。しかし、慢性的甲状腺機能亢進症は、心不全の末期においてErk, AktおよびmTOR経路の下方制御の有意な原因となる。

したがって、ラパマイシン処置はT4-誘発心筋症を防止し、一方マウスにおけるmTORの標的不活化はアポトーシス、ミトファジーおよびミトコンドリア膨化を特徴とする激しい膨張性心筋症を引き起こす。心筋症での酸化ストレスにおけるALCAT1の役割のさらなるサポートとして、ALCAT1過剰発現H9c2細胞において、そして甲状腺機能亢進症のマウスにおいて、慢性酸化ストレスがAktおよび、GSK-3、mTORおよびS6キナーゼなどの下流信号要素、のT4-誘発リン酸化を有意に損なった。H9c2細胞におけるALCAT1による酸化ストレスもまた、心筋症において主要な役割を果たす激しいインシュリン抵抗性の原因となった。対照的に、ALCAT1ノックアウト(KO)マウスにおいて、ALCAT1欠失は心筋症の発症を防止し、そしてAkt-mTOR信号経路を回復した。

【0241】

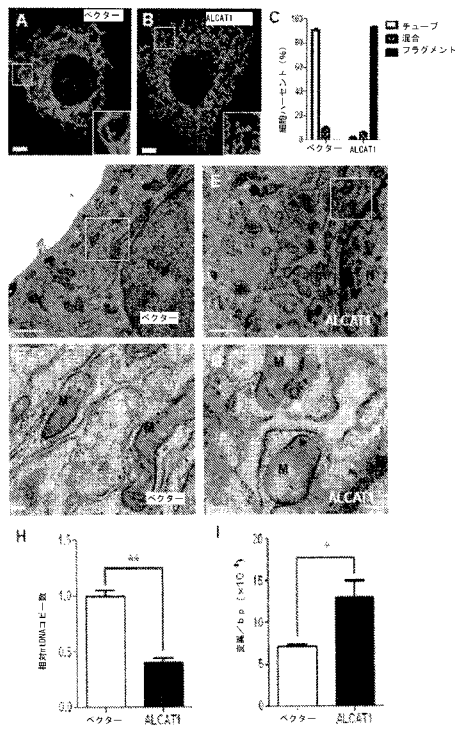
重要なことに、本発明の発見は、糖尿病性心筋症、虚血再灌流および心不全などの循環器疾患の他の形態の原因に横たわる分子機構を解明する将来の研究に追加的な意味を持つ

。なぜならば酸化ストレスおよび生理学的カルジオリピン（CL）再構築はこれらの生理的
 的症状に関係づけられてきたからである。この仮説のサポートとして、ALCAT1は酸
 化ストレスおよび糖尿病と肥満の発症により上方制御された。ALCAT1の標的不活化
 はミトコンドリア機能不全および、2型糖尿病および循環器疾患の主要原因要素である肥
 満、の発症を防止する。ALCAT1の阻害薬の開発は、先進国において主要な死因であ
 る心臓肥大および他の心臓疾病に対する潜在的な治療を提供するであろう。

【0242】

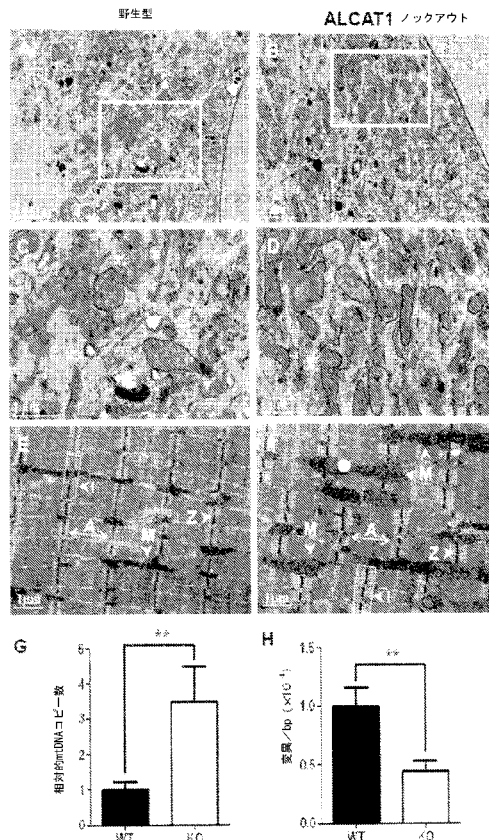
本開示の要約は、読者が本技術的開示の性格を迅速に獲得することを可能にしよう。こ
 の要約は以下の請求項の範囲と意味を翻訳または制限するために使用されないことを前提
 としている。

【図1A - 1I】



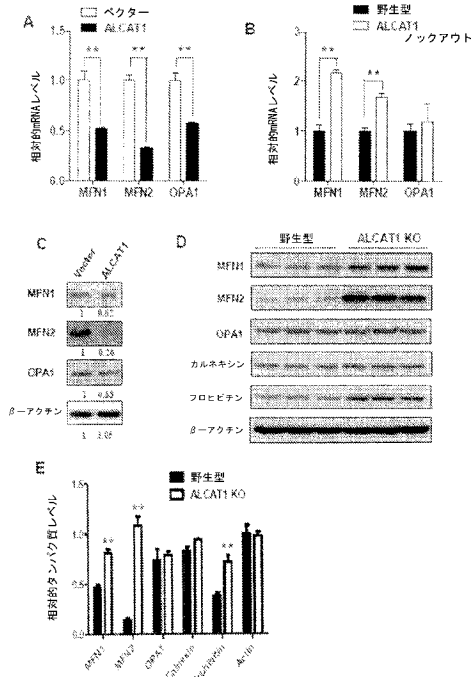
FIGURES 1A-I

【図2A - 2H】



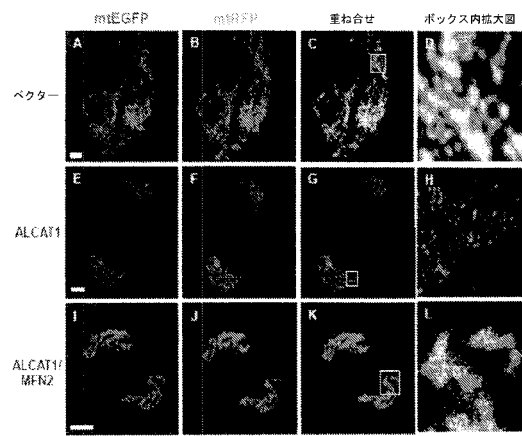
FIGURES 2A-H

【図 3 A - 3 E】



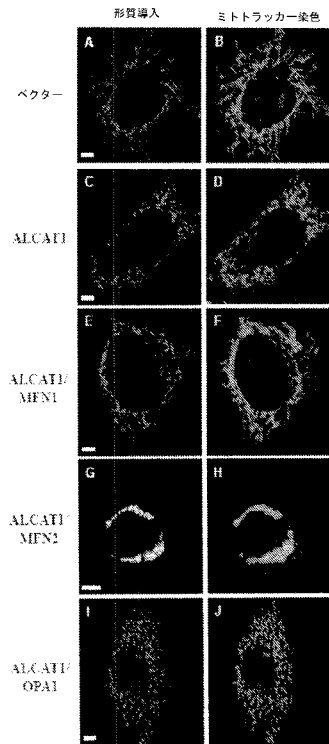
FIGURES 3A-3E

【図 4 A - 4 L】



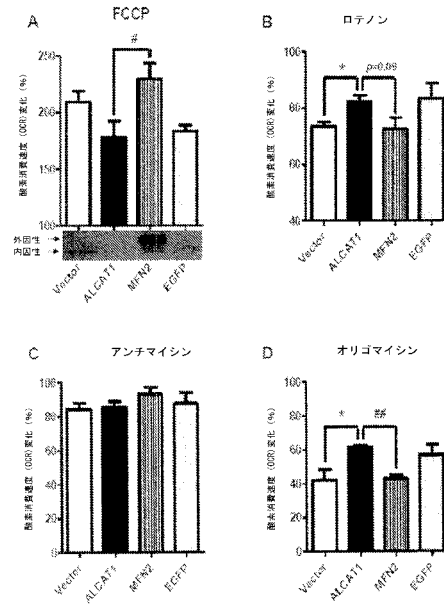
FIGURES 4A-4L

【図 5 A - 5 J】



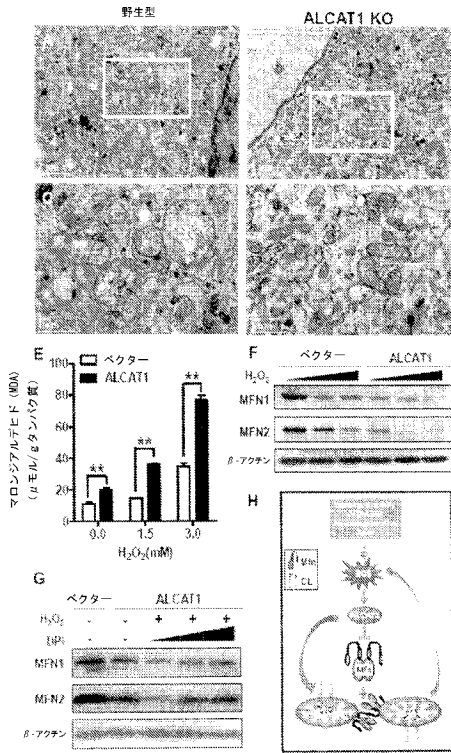
FIGURES 5A-5J

【図 6 A - 6 D】



FIGURES 6A-6D

【 図 7 A - 7 H 】



FIGURES 7A-7H

【 図 8 】

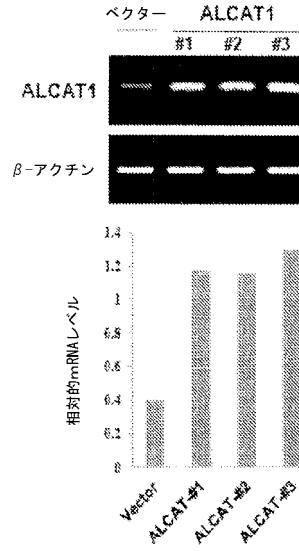
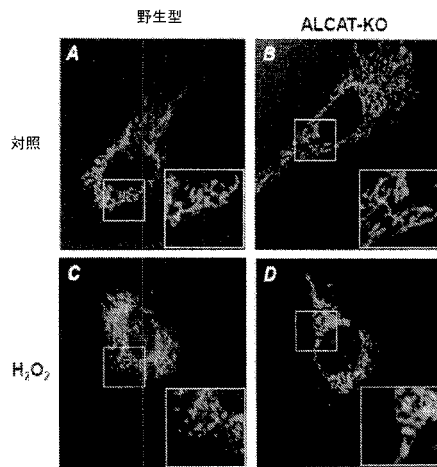


FIGURE 8

【 図 9 A - 9 D 】



FIGURES 9A-9D

【 図 10 】

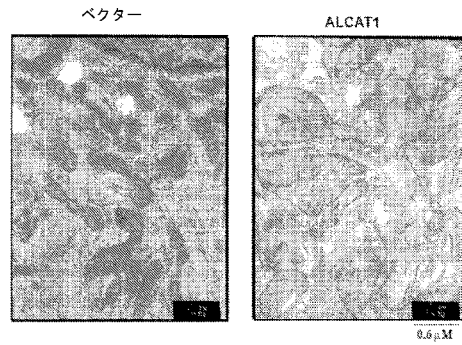
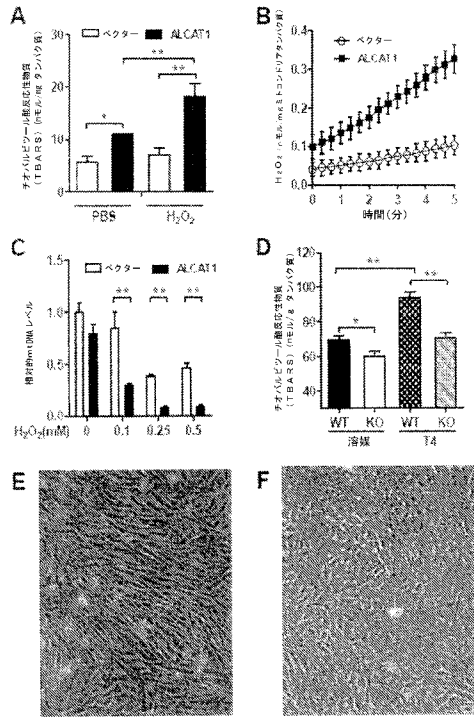


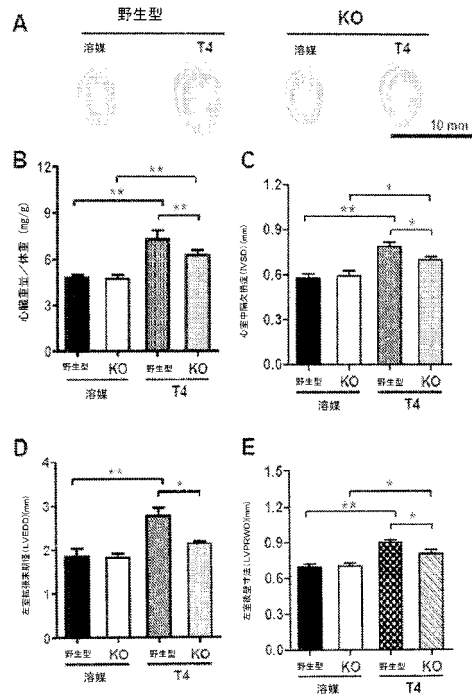
FIGURE 10

【図 11 A - 11 F】



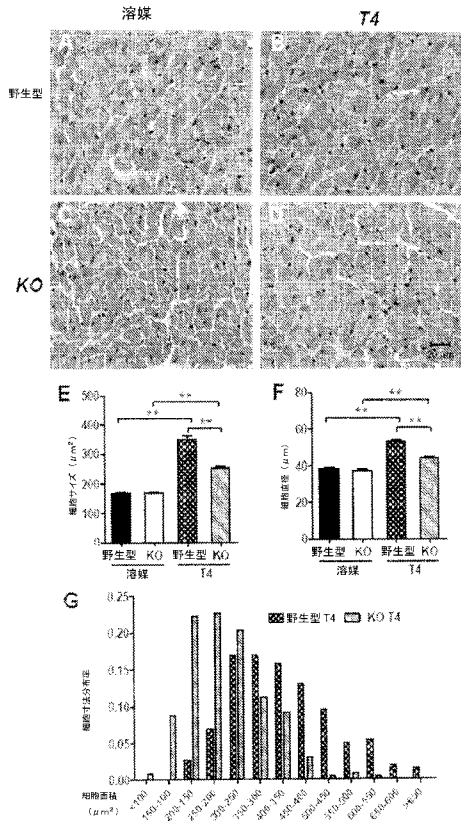
FIGURES 11A-11F

【図 12 A - 12 E】



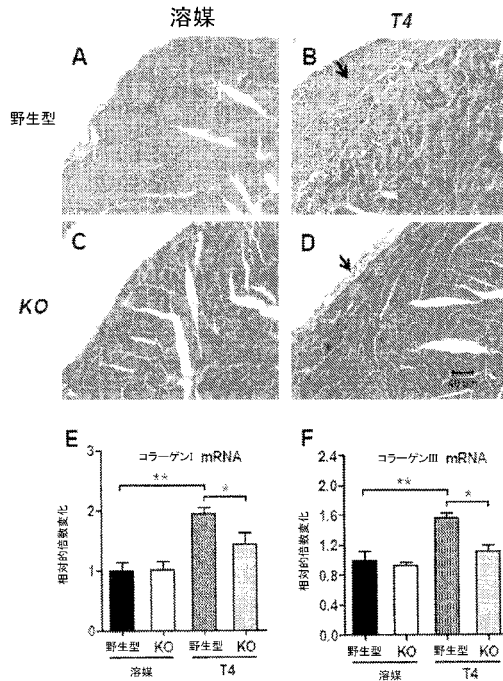
FIGURES 12A-12E

【図 13 A - 13 G】



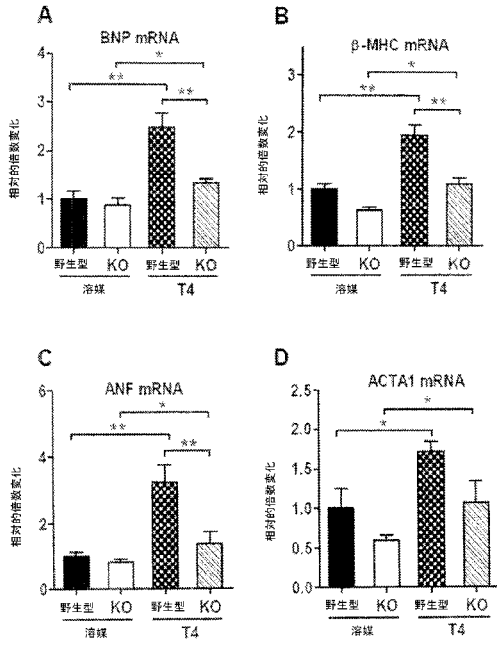
FIGURES 13A-13G

【図 14 A - 14 F】



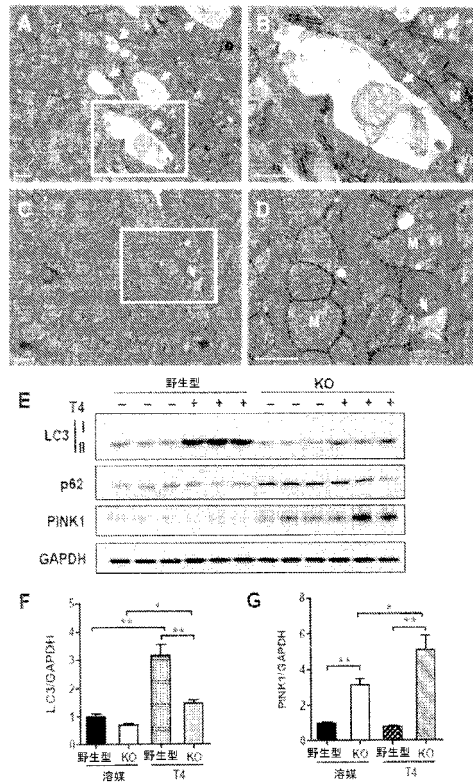
FIGURES 14A-14F

【 図 1 5 A - 1 5 D 】



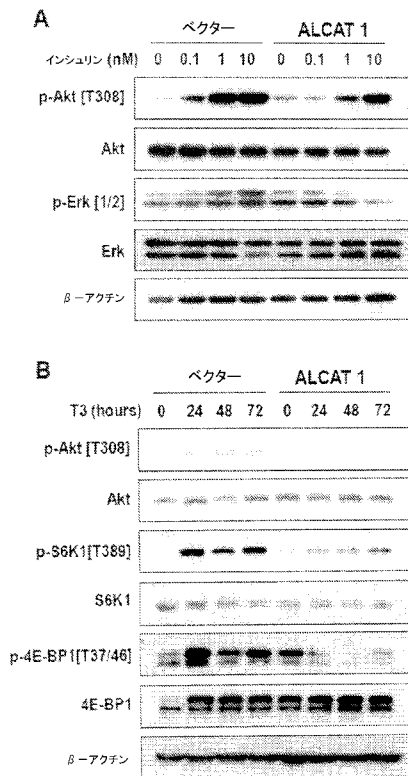
FIGURES 15A-15D

【 図 1 6 A - 1 6 G 】



FIGURES 16A-16G

【 図 1 7 A - 1 7 B 】



FIGURES 17A, 17B

【 図 1 7 C 】

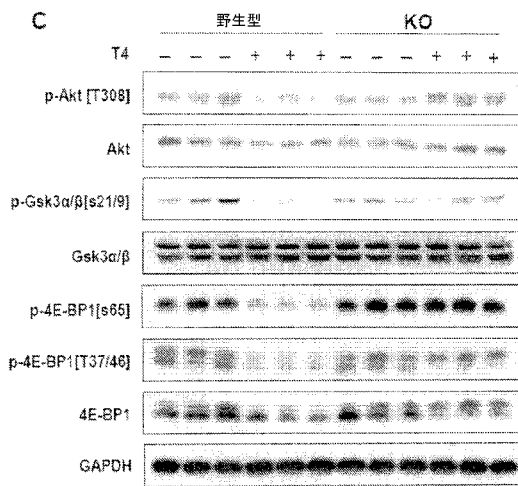
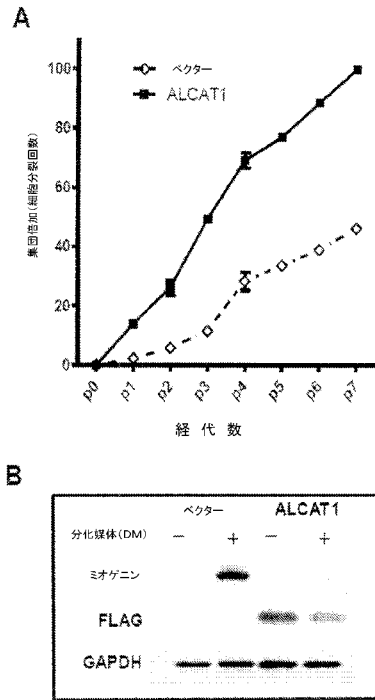


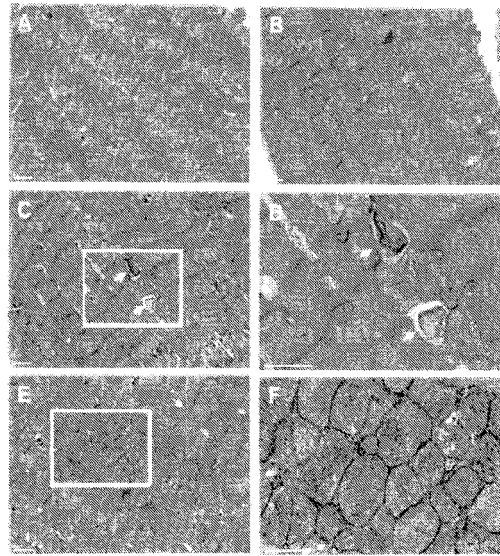
FIGURE 17C

【 図 18 A - 18 B 】



FIGURES 18A, 18B

【 図 19 A - 19 F 】



FIGURES 19A-19F

【 図 20 】

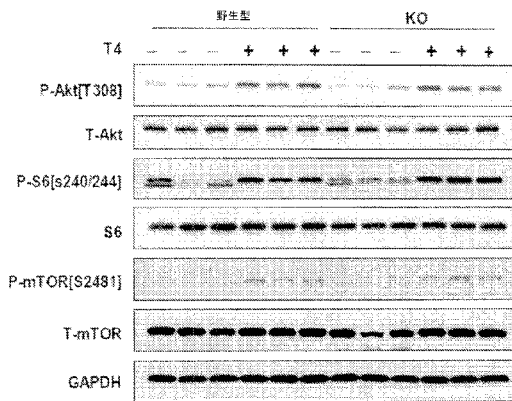
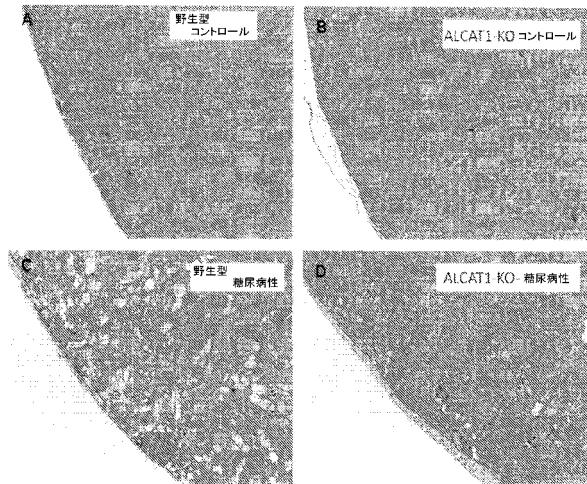


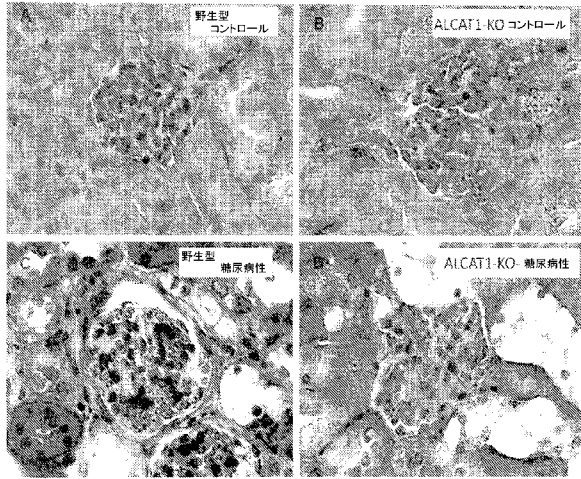
FIGURE 20

【 図 21 A - 21 D 】



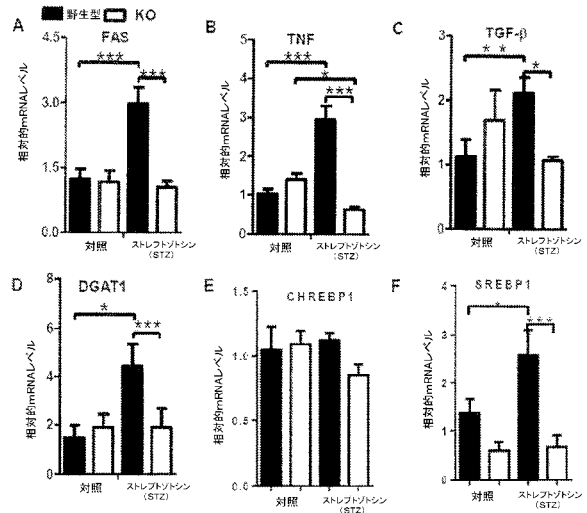
FIGURES 21A-21D

【図 2 2 A - 2 2 D】



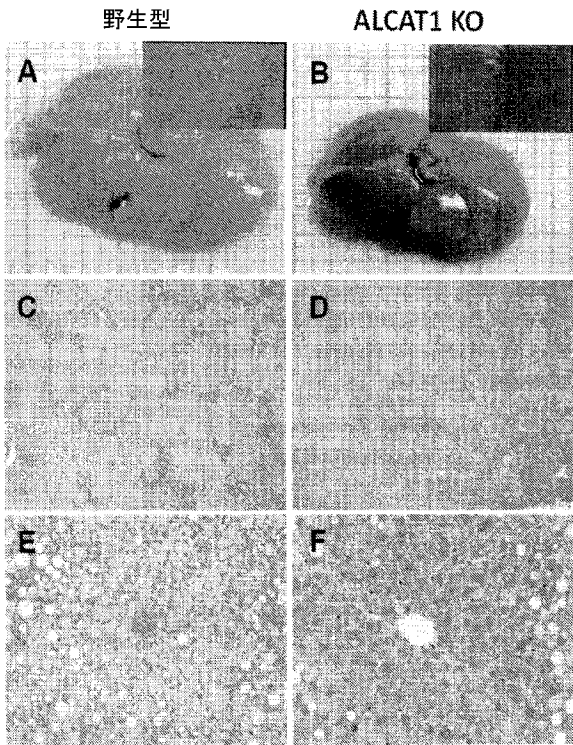
FIGURES 22A-22D

【図 2 3 A - 2 3 F】



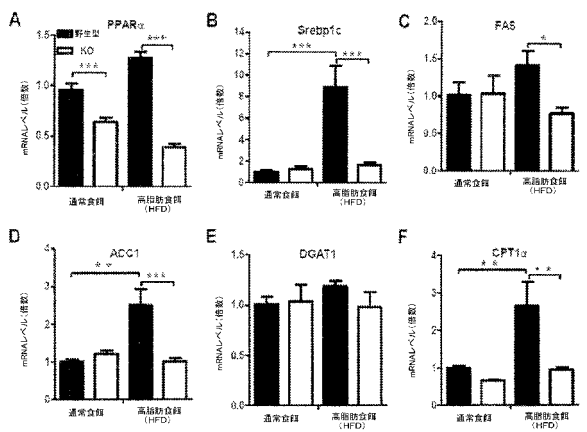
FIGURES 23A-23F

【図 2 4 A - 2 4 F】



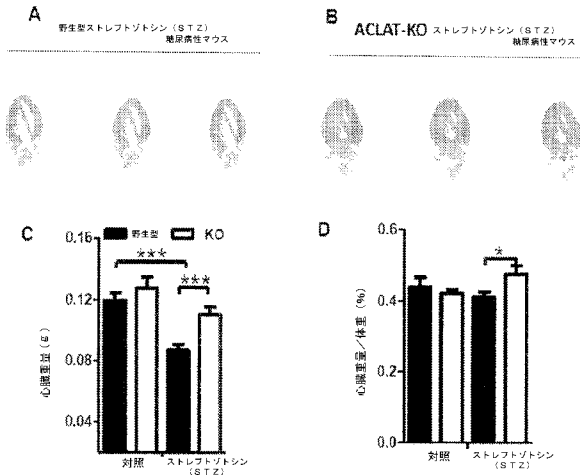
FIGURES 24A-24F

【図 2 5 A - 2 5 F】



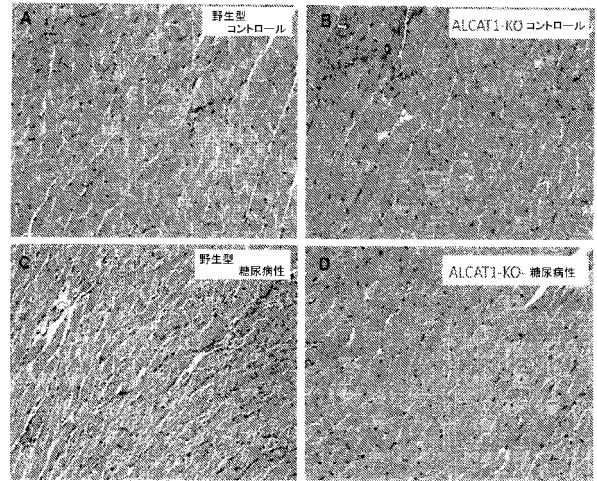
FIGURES 25A-25F

【図 26A - 26D】



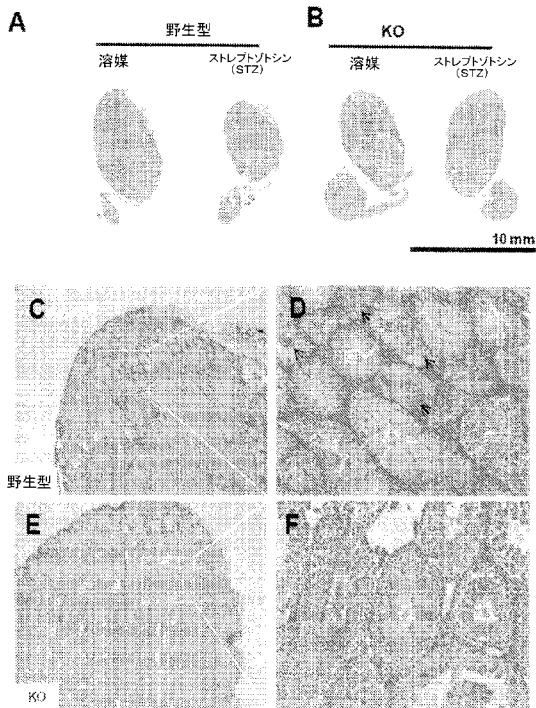
FIGURES 26A-26D

【図 27A - 27D】



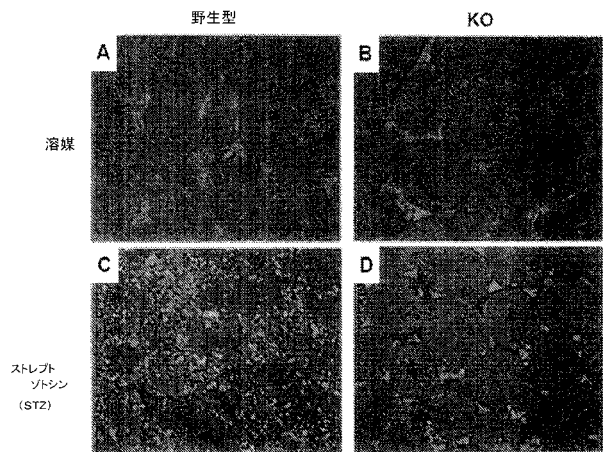
FIGURES 27A-27D

【図 28A - 28F】



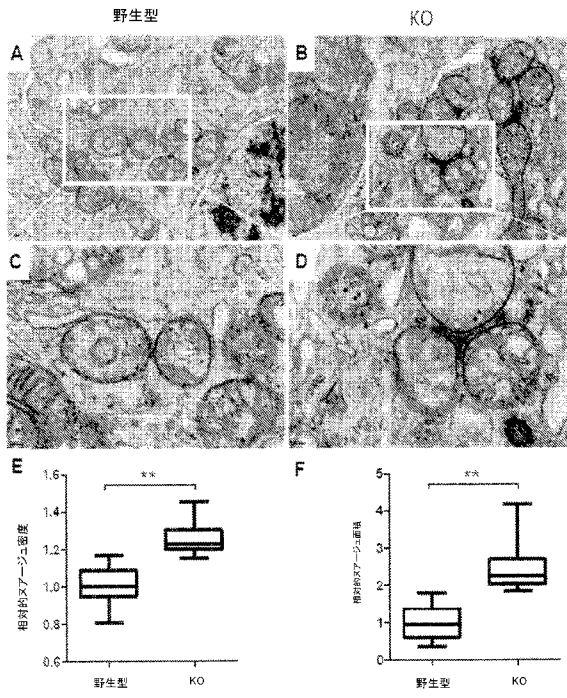
FIGURES 28A-28F

【図 29A - 29D】



FIGURES 29A-29D

【図30A - 30F】



FIGURES 30A-30F

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/026311
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00 (2013.01) USPC - 435/375 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/00, 38/17, 48/00; C12Q 1/68 (2013.01) USPC - 435/6, 6.11, 6.13, 375 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC- A61K 38/00 (2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, Google Scholar, ProQuest, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	CAO et al. 'ALCAT1 is a polyglycerophospholipid acyltransferase potently regulated by adenine nucleotide and thyroid status.' American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. 296. 2009. Pages E647-E653. entire document	13-15, 36-40 25
Y	US 6,127,159 A (FULLER et al) 03 October 2000 (03.10.2000) entire document	23, 24 25
X ---		
Y		
A	LI et al. 'Cardiotipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity.' Cell Metabolism. 12. 04 August 2010. Pages 154-165. entire document	1-51
A	XIONG et al. 'An acyltransferase controls the generation of hematopoietic and endothelial lineages in zebrafish.' Circulation Research. 102. 2008, Pages 1057-1064. entire document	1-51
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 May 2013		Date of mailing of the international search report 24 MAY 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	15/12 (2006.01)	A 6 1 P	15/12	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	15/10 (2006.01)	A 6 1 P	15/10	
A 6 1 P	39/06 (2006.01)	A 6 1 P	39/06	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 1 2 Q	1/06 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06	
C 1 2 N	9/99 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	C 1 2 N	9/99	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/573 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	B
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	G 0 1 N	33/573	A
		C 1 2 N	9/10	
		C 0 7 K	14/47	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

Fターム(参考) 4B050 CC07 DD11 KK03 LL01 LL03
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ26 QQ44 QQ52 QR06 QR32 QR35
 QR40
 4C084 AA02 AA17 BA44 DC50 MA16 MA17 MA22 MA23 MA28 MA52
 MA58 MA59 MA66 NA14 ZA151 ZA361 ZA701 ZA811 ZB221 ZC202
 ZC211 ZC351 ZC411 ZC412
 4H045 AA10 AA30 CA40 EA50

专利名称(译)	酰基辅酶A：溶血脂蛋白-酰基转移酶1 (alcat1) 的修饰剂及其使用方法		
公开(公告)号	JP2015514966A5	公开(公告)日	2017-03-23
申请号	JP2014557806	申请日	2013-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	宾州研究基金会		
申请(专利权)人(译)	笔国家研究基金会		
[标]发明人	シーユーアン		
发明人	シー、ユーアン		
IPC分类号	G01N33/53 A61P43/00 A61K45/00 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/12 A61P25/28 A61P15/10 A61P39/06 A61K38/00 C12Q1/06 C12N15/09 C12N9/99 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/573 C12N9/10 C07K14/47		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K38/46 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/10 A61P15/12 A61P25/28 A61P39/06 A61P43/00 C12Y306/05 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/76 C12N15/1137 C12N2310/111 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D A61P43/00.107 A61K45/00 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/12 A61P25/28 A61P15/10 A61P39/06 A61K37/02 A61P43/00.111 C12Q1/06 C12N15/00.A C12N9/99 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.B G01N33/573.A C12N9/10 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FA02 2G045/FA03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/HA14 4B050/CC07 4B050/DD11 4B050/KK03 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ26 4B063/QQ44 4B063/QQ52 4B063/QR06 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC50 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA52 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084/ZA361 4C084/ZA701 4C084/ZA811 4C084/ZB221 4C084/ZC202 4C084/ZC211 4C084/ZC351 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	斋藤和典		
优先权	61/599496 2012-02-16 US		
其他公开文献	JP2015514966A JP6253596B2		

摘要(译)

提供了酰基辅酶A溶酶体脂质体酰基转移酶1 (ALCAT1) 表达，功能或活性的调节剂的组合物。特别地，ALCAT1的抑制剂可用于治疗代谢疾病，心脏疾病以及通常与线粒体功能障碍相关的疾病。提供了用于鉴定新型ALCAT1调节剂的测定法。