

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3795805号  
(P3795805)

(45) 発行日 平成18年7月12日(2006.7.12)

(24) 登録日 平成18年4月21日(2006.4.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 A 6 1 K 9/70 (2006.01)  
 A 6 1 L 15/44 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A 6 1 K 9/70 4 O 1  
 A 6 1 L 15/03  
 A 6 1 K 37/02  
 A 6 1 P 17/02

請求項の数 14 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-583794 (P2001-583794)  
 (86) (22) 出願日 平成12年12月8日(2000.12.8)  
 (65) 公表番号 特表2004-521605 (P2004-521605A)  
 (43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2000/001428  
 (87) 国際公開番号 W02001/087327  
 (87) 国際公開日 平成13年11月22日(2001.11.22)  
 審査請求日 平成15年1月10日(2003.1.10)  
 (31) 優先権主張番号 2000/25662  
 (32) 優先日 平成12年5月13日(2000.5.13)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

微生物の受託番号 KCTC 0904BP  
 微生物の受託番号 KCTC 0905BP  
 微生物の受託番号 KCTC 0906BP

(73) 特許権者 502411159  
 リージェン バイオテック インコーポレ  
 ーテッド  
 大韓民国 ソウル サングブクーク ハウ  
 オルゴクードン 39-1 キスト シー  
 9231  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (72) 発明者 キム イン-サン  
 大韓民国 テーグ ソーサングーク メー  
 ホードン 1040 ドングス タウン  
 #106-908

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞接着および創傷治癒のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の組換え蛋白質いずれか1つを用いて哺乳類細胞を接着する方法：

1) ig-h3の第2 fas-1ドメインの複数コピーからなり、哺乳動物細胞を接着する活性を有する組換え蛋白質；2) ig-h3の第4 fas-1ドメインの複数コピーからなり、哺乳動物細胞を接着する活性を有する組換え蛋白質；または3) ig-h3の第2 fas-1ドメインの1コピー若しくは複数コピー及び ig-h3の第4 fas-1ドメインの1コピー若しくは複数コピーからなり、哺乳動物細胞を接着する活性を有する組換え蛋白質。

【請求項2】

該第2 fas-1ドメインが、ig-h3の237～377位のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

該第4 fas-1ドメインが、ig-h3の498～637位のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】

該組換え蛋白質が、ig-h3の498～637位のアミノ酸配列からなる該第4 fas-1ドメインを4重に重複して含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】

受託番号KCTC 0905BPで識別される大腸菌株中に保持される発現ベクター（ここで、該発現ベクターは、ig-h3の237～377位のアミノ酸配列をコードするDNAを含み、ig-h3の第2 fas-1ドメインを含む組換え蛋白質を発現する能力を有する。）。

【請求項6】

請求項5記載の発現ベクターで形質転換され、受託番号KCTC 0905BPとして識別される大腸菌株。

【請求項7】

受託番号KCTC 0904BPで識別される大腸菌株中に保持される発現ベクター（ここで、該発現ベクターは、ig-h3の498～637位のアミノ酸配列をコードするDNAを含み、ig-h3の第4 fas-1ドメインを含む組換え蛋白質を発現する能力を有する。）。

10

【請求項8】

請求項7記載の発現ベクターで形質転換され、受託番号KCTC 0904BPとして識別される大腸菌株。

【請求項9】

受託番号KCTC 0906BPで識別される大腸菌株中に保持される発現ベクター（ここで、該発現ベクターは、ig-h3の498～637位のアミノ酸配列を4重に重複して有するアミノ酸配列をコードするDNAを含み、ig-h3の第4 fas-1ドメインを複数コピー含む組換え蛋白質を発現する能力を有する。）。

【請求項10】

請求項9の発現ベクターで形質転換され、受託番号KCTC 0906BPとして識別される大腸菌株。

20

【請求項11】

以下の段階を含む、請求項1記載の方法：

- 1) 請求項1記載の組換え蛋白質を調製する段階；
- 2) 該組換え蛋白質を固相支持体上にコーティングする段階；および
- 3) 該組換え蛋白質でコーティングした固相支持体上に細胞を添加する段階。

【請求項12】

下記の組換え蛋白質のいずれか1つを含有する創傷治癒剤：

1) ig-h3の第2 fas-1ドメインの複数コピーからなり、哺乳動物細胞を接着する活性を有する組換え蛋白質；

30

2) ig-h3の第4 fas-1ドメインの複数コピーからなり、哺乳動物細胞を接着する活性を有する組換え蛋白質；または

3) ig-h3の第2 fas-1ドメインの1コピー若しくは複数コピー及び ig-h3の第4 fas-1ドメインの1コピー若しくは複数コピーからなり、哺乳動物細胞を接着する活性を有する組換え蛋白質。

【請求項13】

該組換え蛋白質が、下記のいずれか1つである請求項12記載の創傷治癒剤：

1) 該第2 fas-1ドメインが、ig-h3の237～377位のアミノ酸配列からなることを特徴とする組換え蛋白質；

2) 該第4 fas-1ドメインが、ig-h3の498～637位のアミノ酸配列からなることを特徴とする組換え蛋白質；または

40

3) ig-h3の498～637位のアミノ酸配列からなる該第4 fas-1ドメインを4重に重複して含むことを特徴とする組換え蛋白質。

【請求項14】

該組換え蛋白質が、固相支持体にコーティングされていることを特徴とする請求項12または13に記載の創傷治癒剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は細胞接着および創傷治癒に使用するペプチドに関する。より詳細には、本発明は

50

ig-h3の第2および/または第4 fas-1ドメインを1コピーまたは複数コピー含むペプチドの、細胞接着および創傷治癒における使用に関するが、この第2および/または第4ドメインは、インテグリンへの結合に必須で、細胞接着を仲介する2つのアミノ酸、アスパラギン酸およびイソロイシンに高度の相同性を持つ。また、本発明は細胞接着および創傷治癒に有用なペプチドの発現系にも関する。

#### 【0002】

##### 発明の背景

ig-h3は細胞外マトリックス蛋白質であり、その発現は、活性型TGF- $\beta$ のシグナル伝達に続いて、ヒトメラノーマ細胞、乳房上皮細胞、ケラチノサイト、および肺線維芽細胞を含む種々の細胞株で誘導される (Skonier, J.ら、DNA Cell Biol. 13、571、1994)。 ig-h3遺伝子は、TGF- $\beta$ で処理されたヒト肺腺癌細胞株から作製されたcDNAライブラリーのディファレンシャルハイブリダイゼーションスクリーニングによって、最初に単離された。 ig-h3遺伝子は、種間で高度に保存されている683アミノ酸の蛋白質をコードしている。これは、N末端に分泌シグナルペプチド、C末端にArg-Gly-Asp (RGD)モチーフを含んでいる。RGDモチーフは、細胞接着を調節する多くの細胞外マトリックス蛋白質に見出され、いくつかのインテグリンのリガンド認識配列となっている (Stonier, J.ら、DNA Cell Biol.、11、511、1992)。

#### 【0003】

いくつかの研究によると、 ig-h3は細胞の成長および増殖、創傷治癒、ならびに細胞接着に関与していることが知られているが、これらの機能の根底にある機序は、いまだ不明である。しかし、 ig-h3は様々な組織において、形態形成、および細胞と細胞外マトリックス蛋白質の相互作用に重要な働きをしていると考えられる。

#### 【0004】

細胞接着および剥離の仲介における ig-h3の役割に関連する証拠が、いくつかの研究で提供されている。例えば、精製 ig-h3蛋白質は、皮膚の線維芽細胞の接着および伸展を促進するが、無血清培地中で、A549、HeLaおよびWi-38細胞の接着を阻害することがわかっている。特に、 ig-h3は腫瘍細胞の増殖に阻害活性があり、コロニー形成および形態に影響を与えることが知られている。阻害活性は、 ig-h3発現プラスミドをCHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞にトランスフェクトすると、細胞の増殖、およびこれらの細胞がヌードマウスで腫瘍を形成する能力が著しく低下したという報告によって、示されている。さらに、創傷治癒法は、薬学的に有効量の ig-h3を創傷に塗布すると、細胞、特に線維芽細胞が創傷部位に広がり、接着するという知見に基づいて、開発された。したがって、様々な細胞株においてTGF- $\beta$ によって誘導される細胞接着分子である ig-h3は、細胞の増殖、細胞の分化、創傷治癒、形態形成、および細胞接着に非常に重要な役割を果たす (Rawe, I.M.ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38、893、1997; Lebaron, R. G.ら、J. Invest. Dermatol. 104、844、1995)。

#### 【0005】

ig-h3は、内部の相同性を持つ140アミノ酸、すなわちfas-1ドメインの繰り返しを4つ含む。内部の繰り返しドメインは、哺乳類、昆虫、ウニ、植物、酵母、および細菌を含む様々な種の分泌蛋白質または膜蛋白質に見られる、高度に保存された配列を持つ。保存された配列を含む蛋白質の例は、ペリオスチン、ファシクリンI、ウニHLC-2、藻類のCAM、およびマイコバクテリウムMPB70である。これらの蛋白質の保存されたドメイン (以後、fas-1と呼ぶ) は、各々約10アミノ酸の2つの高度に保存された枝、H1およびH2を持つ約110アミノ酸から140アミノ酸から構成されている (Kawamoto, T.ら、Biochem. Biophys. Acta. 1395、288、1998)。

#### 【0006】

4つのfas-1ドメインは、 ig-h3、ペリオスチン、およびファシクリンIに見られ、2つのfas-1ドメインはHLC-2、1つのみのfas-1ドメインはMPB70に見られる。これらの蛋白質の機能は明らかにされていないが、そのいくつかは、細胞接着分子として作用することが知られている。例えば、 ig-h3、ペリオスチン、およびファシクリンIは、それぞれ線維芽細胞

10

20

30

40

50

胞、骨芽細胞、および神経細胞の接着を仲介すると報告されている。また、藻類のCAMが藻類ボルボックスの胚に存在する細胞接着分子であることが開示されている (LeBaron, R. G.ら、J. Invest. Dermatol. 104、844、1995; Horiuchi, K.ら、J. Bone Miner. Res. 14、1239、1999; Huber, O.ら、EMBO J. 13、4212、1994)。

#### 【0007】

当初、ig-h3の細胞接着活性はC末端のRGDモチーフによって仲介されると考えられていた。しかし、研究の結果、RGDモチーフは軟骨細胞の伸長の促進に必要ではなく、C末端のプロセッシングによってRGDモチーフが削除された成熟可溶性 ig-h3が細胞接着を阻害できることが分かり、ig-h3のRGDモチーフは、ig-h3の細胞接着活性の仲介にはなくても構わないという結論に達した。さらに、ig-h3のRGDモチーフは ig-h3の細胞接着特性の仲介には不要である一方で、ig-h3はインテグリン 1 1を介して線維芽細胞の伸長を促進することが最近報告された。最近の報告によると、ig-h3はインテグリンに特異的に結合し、RGDモチーフには関係なく、細胞接着および細胞の伸長を促進する (Ohno, S.ら、Biochem. Biophys. Acta 1451、196、1999)。さらに、ig-h3の保存されたペプチドH1およびH2は、ig-h3を介する細胞接着には影響しないことが分かった。これらの結果を合わせると、ig-h3の細胞接着活性に不可欠なアミノ酸は、H1およびH2領域以外のどこかに存在すると示される。ig-h3の繰り返しのfas-1ドメインの間のみならず他の蛋白質のfas-1ドメインの間の相同性に基づくコンピュータ検索では、H1およびH2ペプチド以外に、いくつかの高度に保存されたアミノ酸があることが明らかにされ、これは細胞接着活性にこの保存されたアミノ酸配列が関与している可能性を示唆する。

#### 【0008】

細胞接着に重要な役割を果たすことが知られている ig-h3のドメインのうち、第2または第4ドメインのいずれかが、本発明に係る分子の細胞接着に必須の最小のドメインと同定される。これらの知見に基づき、この必須の機能的ドメインを含む組換え蛋白質も、本発明に係る創傷治癒に有効であると同定される。

#### 【0009】

創傷治癒の最近の研究は、細胞生物学と分子生物学に分かれており、創傷治癒の促進は、種々の臨床分野に拡大している応用法がある。しかし、創傷治癒の細胞生物学的および分子生物学的機構は、いまだ不明である。現在までに開示された知見によると、創傷治癒は外傷に対する組織の応答で、化学走性、細胞の分化と複製、マトリックス蛋白質の合成、血管新生、および創傷の再建を含む、複雑な生物学的過程を通して組織の修復が行われる (Steed, D. L.ら、Clin. Plast. Surg. 25、397、1998)。

#### 【0010】

成長因子は、創傷治癒過程の初期段階に出現し、その後の創傷治癒過程を制御する、代表的な物質である。創傷治癒の全ての段階に大きな影響を持つ成長因子は、細胞の増殖、分化、および代謝を制御し、炎症と組織修復、細胞増殖に関与する種々の種類の細胞を引きつける化学走性の特性によって創傷の環境を再編成するために作用し、血管新生および細胞外マトリックスの合成および分解を刺激する。PDGF (血小板由来成長因子) は線維芽細胞を創傷に引きつけ、増殖させるが、トランスフォーミング成長因子 (TGF-) はそれらにコラーゲンを合成させる。PDGFは創傷治癒に関与する大部分の細胞に化学走性を引き起こし、血管新生、再構成、および収縮を刺激し、創傷治癒細胞を活性化する (Mustoe, T. A.ら、J. Clin. Invest. 87、694、1991; Lepisto, J.ら、J. Surg. Res. 53、596、1992)。EGF (上皮成長因子) はケラチノサイトの移動、血管新生、および顆粒化組織発生を刺激し、ケラチノサイトおよび線維芽細胞の有糸分裂誘発を活性化する (Franklin, J. D.ら、Plast. Reconst. Surg. 64、766、1979; Buckly, A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82、7340、1985)。bFGF (塩基性線維芽細胞成長因子) は血管新生、上皮化、およびコラーゲン線維の沈着を刺激し、種々の形のヘパリンと会合して関連する機能を果たす (Tsuboi, R.ら、J. Exp. Med. 172、245、1990; Kinsnorth, A. N.ら、Br. J. Surg. 77、409、1990)。IGF (インスリン様成長因子) は細胞の分化を促進する。VEGF (血管内皮成長因子) は血管の透過性を上昇し、内皮の分裂を促進する。

## 【0011】

創傷治癒に関与する成長因子やサイトカインのうちで、TGF- が最も代表的である。このサイトカインは哺乳類では3つの形態で存在し（TGF- 1、TGF- 2、およびTGF- 3）、様々な細胞の増殖と分化に重要な役割を果たし、細胞増殖の制御、免疫応答の調節、骨形成の刺激、軟骨特異的高分子の誘導、および創傷治癒の促進を含む種々の複雑な機能を持つ（Bennett, N. T.ら、Am. J. Surg. 165、728、1993）。TGF- は創傷治癒時には上皮に出現し、再上皮化の際にケラチノサイト内でインテグリン発現を刺激すると考えられている。TGF- 発現の最近の研究では、TGF- 3 mRNAは正常な皮膚の上皮ならびに急性および慢性の創傷で発現され、TGF- 1 mRNAは正常な皮膚および慢性創傷で発現されないが、急性の創傷から再生した上皮層で発現され、TGF- 2 mRNAはどこでも発現されないことが分かった（Schmid, P.ら、J. Pathol. 171、191、1993）。この作用から、機構ははっきりと確立していないものの、TGF- は再上皮化に重要な役割を果たしていると期待される。

10

## 【0012】

ig-h3の発現はTGF- によって上方制御されており、これは ig-h3がTGF- の何らかのシグナル伝達の仲介に関与していることを示唆する。ig-h3発現プラスミドで形質転換されたCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞は、腫瘍発生能力が低下していることが報告されている（Skonier, J.ら、DNA Cell Biol. 13、571、1994）。反対に、ig-h3はデキサメタゾン処理した幹細胞、一部の腫瘍細胞、およびメロレオストーシスの限局性骨化過剰の皮膚病変部から培養された線維芽細胞で下方制御されている。ig-h3は骨形成の負の調節因子として働くことも報告されている（Genini, M.ら、Int. J. Cancer 66、571、1996；Schenker, T.ら、Exp. Cell. Res. 239、161、1998；Kim, J.ら、J. Cell Biochem. 77、169、2000）。これらの機能に加え、細胞接着分子として知られる ig-h3は、皮膚において線維芽細胞の接着と伸長を促進する。目の組織における ig-h3の分布の研究によると、この接着分子は正常な成人の角膜上皮、角膜内胎児間質細胞、ならびに創傷治癒過程における内皮および間質細胞で発現されると報告されている。さらに、ig-h3は腎臓の傍系球体装置および近位尿細管で発現されており、その発現は真性糖尿病で増加する。さらに、正常人の冠動脈の内皮下平滑筋にも見つかっており、その量は動脈硬化の血管内皮で増加している。しかし、正常な皮膚組織および皮膚創傷における ig-h3の発現ははっきりと確立していない（Klintworth, G. K.ら、Am. J. Pathol. 152、743、1998；Munier, F. L.ら、Nature Genetics 15、247、1997；Streeten B. W.ら、Arch. Ophthalmol. Vis. Sci. 38、893、1997）。上述のように、正常ヒト組織における ig-h3の分布と発現は、まだ明らかではない。特に、皮膚創傷における ig-h3の発現パターンに関する報告はない。しかし、一部の研究グループらは、ig-h3は皮膚の線維芽細胞の接着と伸長を促進するように機能すると報告しているので、創傷治癒の促進に貢献すると期待される。

20

30

## 【0013】

## 発明の概要

このような背景を考慮に入れ、本発明に至る ig-h3の仲介する細胞接着に関する集中的で徹底的な研究の結果、コンピュータ検索による分析で、ig-h3のfas-1ドメインおよび他のペプチドのfas-1ドメインの間に、H1およびH2モチーフに加えて、高度に保存されたアミノ酸配列が存在し、特に、H2領域の付近の位置のアスパラギン酸およびイソロイシン残基に高度な相同性が検出されるという知見が得られた。さらに、各々保存されたアミノ酸残基を含む ig-h3の第2および第4ドメインは、 $\alpha$ 3 $\beta$ 1インテグリンを介した細胞接着を誘導することが分かった。さらに、ig-h3の第2および/または第4 fas-1ドメインを持つようにデザインされた組換え蛋白質は、細胞接着および伸長活性、ならびに創傷治癒効果の点では、野生型の ig-h3と同一であると同定された。

40

## 【0014】

したがって、細胞接着、伸長、および剥離活性に必須の保存されたアミノ酸配列を含むペプチドを提供することは、本発明の目的である。

## 【0015】

50

細胞接着および創傷治癒における該ペプチドの使用法を提供すること、本発明のもう1つの目的である。

【0016】

該ペプチドの発現系を提供すること、本発明の更なる目的である。

【0017】

細胞を接着する方法を提供すること、本発明のまた更なる目的である。

【0018】

創傷治癒の方法を提供すること、本発明のさらにもう1つの目的である。

【0019】

本発明の1つの局面により、哺乳類細胞の接着に有用な *ig-h3* のドメインの一部を含む組換え蛋白質が提供される。 10

【0020】

本発明の別の局面により、それぞれアミノ酸237～377位および498～637位に対応する、*ig-h3* の第2および第4 *fas-1* ドメインを発現する能力のある発現ベクター、*p ig-h3 D-II*、*p ig-h3 D-IV*、および *p ig-h3 D-IV 4X* が提供される。

【0021】

本発明の更なる局面により、それぞれ発現ベクター *p ig-h3 D-II*、*p ig-h3 D-IV*、および *p ig-h3 D-IV 4X* で形質転換された大腸菌 (*E. coli*) 株が提供され、これらは大腸菌 BL21/His<sup>-</sup>g (受託番号 KCTC 0905BP)、大腸菌 BL21/His<sup>-</sup>e (受託番号 KCTC 0904BP) および大腸菌 BL21/His<sup>-</sup>e4x (受託番号 KCTC 0906BP) として識別された。 20

【0022】

本発明のまた更なる別の局面により、以下の段階を含む、細胞を接着する方法が提供される：発現ベクターを用いて *ig-h3* の第2および/または第4ドメインを1コピーまたは複数コピー含む組換え蛋白質を調製する段階；組換え蛋白質を固相支持体にコーティングする段階；および蛋白質でコーティングされた固相支持体に細胞を添加する段階。

【0023】

本発明のさらに別の局面により、細胞接着における組換え蛋白質の使用が提供される。

【0024】

本発明のさらに別の局面により、創傷治癒における組換え蛋白質の使用が提供される。

【0025】

本発明のまたさらに別の局面により、以下の段階を含む、創傷治癒方法が提供される：*ig-h3* の第2および/または第4ドメインを1コピーまたは複数コピー含む組換え蛋白質で固相支持体をコーティングする段階；固相支持体に皮膚細胞を接着させる段階；および固相支持体を創傷に当てる段階。 30

【0026】

#### 発明の詳細な説明

本発明では、*ig-h3* の第2および第4 *fas-1* ドメインに基づいて組換え蛋白質が調製され、単独または組み合わせて細胞接着および伸長のために使用される。第2および第4ドメインを選択するために、細胞接着および伸長で活性な *ig-h3* のドメインが同定された。そのために、いくつかのインテグリンでリガンド認識配列として知られるC末端配列 Arg-Gly-Asp (RGD) について、*ig-h3* の細胞接着特性に対するその影響を調べた。細胞接着活性は、接着した細胞の数および表面積を用いて測定された。その結果、*ig-h3* は RGD モチーフとは無関係に、細胞接着および伸長を促進することが分かった。 40

【0027】

この結果を元にして、化学試薬を用いて、*ig-h3* の細胞接着活性の特異性を調べ、*ig-h3* の細胞表面受容体の性質に関するさらなる手がかりを得た。化学試薬を用いて得られたデータは、*ig-h3* の細胞接着活性に関与している *ig-h3* の細胞表面受容体が、RGD 依存性インテグリンの1つで、*ig-h3* との相互作用には2価の陽イオンが必要である可能性を示唆する。

【0028】

次に、 ig-h3の細胞接着機能に必須の最小ドメインを同定するために、各 fas-1ドメインが細胞接着を仲介する能力を調べた。

【 0 0 2 9 】

この実験は、 fas-1ドメインが、 ig-h3、ペリオスチン、ファシクリンI、HLC-2、および藻類CAMのような様々な細胞接着分子に見られ、そのような接着分子中に存在する fas-1ドメインの数が蛋白質によって異なるという事実に基づいていた。この事実から、 ig-h3の細胞接着活性には4つの fas-1ドメインすべてが必要ではない可能性があり、極端な場合には1つのドメインのみが ig-h3の細胞接着活性を仲介する可能性があるとして推論された。本発明では、 ig-h3の第2または第4 fas-1ドメインのいずれかで、 ig-h3の細胞接着機能には十分であることが明らかである。これらの結果により、 ig-h3の4つのドメインに共通のH1およびH2配列は、 ig-h3の細胞接着活性の仲介には必須ではないという結論に至る。さらに、2つのアミノ酸、すなわち第2および第4 fas-1ドメイン内のH2領域付近の位置でアスパラギン酸およびイソロイシンが高度に保存されていることが見出され、これはこれらのアミノ酸残基が細胞接着関連モチーフを構成することを示した。細胞接着にこの2つの保存されたアミノ酸が必須であることは、 ig-h3の第4 fas-1ドメインの置換変異体を用いて同定された。

【 0 0 3 0 】

本発明の別の態様では、 ig-h3の第2および第4 fas-1ドメインが、個別にまたは組み合わせて使用される創傷治癒法が提供される。

【 0 0 3 1 】

細胞接着活性ドメインのみを含む変異 ig-h3蛋白質と、ドメインの一部を含む野生型 ig-h3 ( ig-h3-WT) の創傷治癒効果が比較された。このため、細胞接着活性ドメインを含む組換え蛋白質がラットに塗布された。

【 0 0 3 2 】

ig-h3の第4 fas-1ドメインを含む組換え蛋白質が軟膏の薬学的に有効な成分として使用されると、再上皮化および膠原線維の形成に加えて、創傷の収縮が観察された。最終的には、これらの結果は、保存されたアスパラギン酸およびイソロイシンの存在する ig-h3の第2または第4 fas-1ドメインの1つが、創傷治癒に有用で、このため創傷の治療薬の開発に用いることができることを意味する。

【 0 0 3 3 】

また、 ig-h3の第2 fas-1ドメインまたは第2および第4ドメインを含む組換え蛋白質を用いると、優れた細胞接着および創傷治癒効果が得られた。

【 0 0 3 4 】

全てのドメインを含む蛋白質と比較して、ドメインの一部を含む組換え蛋白質は、水溶性の形態で合成されるので変性を受けないために、大量に生成できるという利点を有する。

【 0 0 3 5 】

実施例

以下の実施例を考慮すると本発明がより良く理解できるが、以下の実施例は本発明の説明のためであり、本発明を制限すると解釈されるべきものではない。

【 0 0 3 6 】

実施例 1

RGD非依存性 ig-h3蛋白質の細胞接着活性の同定

1-1 組換え ig-h3蛋白質の生成

実際に細胞接着および伸長活性を持つ ig-h3のドメインを見つけるために、リガンド認識配列として知られるC末端配列Arg-Gly-Asp (RGD)を ig-h3の細胞接着特性に対する影響について調べた。そのため、RGDの削除された組換え ig-h3蛋白質 ( igh3- RGD) および野生型組換え ig-h3蛋白質 ( igh3-WT) が調製された。

【 0 0 3 7 】

まず、pBluescriptにクローニングされた全長ヒト ig-h3 cDNA (pBs ig-h3)がNdeIおよびBglIIで消化された。このDNA断片は、pET-29b(+) (Novagen Inc.)のEcoRV-EcoRI部位に

10

20

30

40

50

サブクローニングされた。 igh3-WTは ig-h3 cDNAから切り出された1351 bpのNcoI断片をこのクローンのNcoI部位に導入して調製された。 igh3 RGDは、図1に示すように、igh3-WTプラスミドの3'断片をAocIおよびNotIで切り出して、平滑末端化および自己連結させることによって、 igh3-WTから誘導された。

#### 【0038】

各組換えプラスミドで形質転換した大腸菌 BL 21 DE3は、595 nmにおける光学濃度(OD)が0.5~0.6に達するまで、50 µg/mlカナマイシンを含むLB培地中で37 °Cで培養された。組換え ig-h3蛋白質は、1 mMイソプロピル-β-D-(-)-チオガラクトピラノシド (IPTG)を用いて37 °Cで3時間誘導された。沈殿を溶解緩衝液(50 mMトリス塩酸(pH 8.0)、100 mM NaCl、1mM EDTA、1% トライトンX-100、1 mM PMSF、0.5 mM DTT)に再懸濁して、その後超音波処理した。封入体を20 mMを含む8M尿素の変性緩衝液で溶解し、変性した蛋白質をNi-NTA樹脂(Qiagen)を用いて精製した。組換え蛋白質は200 mMイミダゾール溶液で溶出し、その後50 mM NaClを含む20 mMトリス塩酸緩衝液中で尿素を高濃度から低濃度に順次下げて透析した。これらの組換え蛋白質は、図2に示すようにSDS-PAGEを用いて解析した。

#### 【0039】

1-2 組換え ig-h3 fas-1ドメイン蛋白質の細胞接着活性についてのアッセイ法 このアッセイ法に使用したヒト角膜上皮(HCE)細胞は、15% 牛胎児血清、ゲンタマイシン(40 µg/ml)、インスリン(5 µg/ml)、コレラ毒素(0.1 µg/ml)およびヒト上皮成長因子(hEGF)を補充したDMEM(EMEM/F-12, Gibco BRL)で、5% CO<sub>2</sub>中で37 °Cで培養された。

#### 【0040】

細胞接着アッセイ法は以下のように実行された。まず、組換え ig-h3蛋白質または他の細胞外マトリックス蛋白質を、37 °Cで1時間インキュベートして96穴マイクロ培養プレート(Falcon)の底に接着させ、0.2% BSAを含むPBSでブロッキングした。コーティングされた細胞外マトリックス蛋白質は、ヒト血漿ビトロネクチン(Promega)、精製ヒト血漿フィブロネクチン(pFN)、ニワトリI型およびII型コラーゲン(Chemicon International Inc.)、ウシIVおよびVI型コラーゲン(Chemicon)、マウスラミニン(Chemicon)、およびウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma)だった。細胞をトリプシン処理し、2 x 10<sup>5</sup>細胞/mlの濃度で培地中に再懸濁した。細胞懸濁液0.1 mlを組換え蛋白質でコーティングされたプレートの各ウェルに添加した。

#### 【0041】

37 °Cで1時間インキュベーション後、接着しなかった細胞をPBSで洗い流した。接着した細胞をヘキサミンダーゼの基質として3.75 mM p-ニトロフェノール-N-アセチル 1-β-D-グリコサミニドおよび0.25% トライトンX-100を含む50 mMクエン酸緩衝液pH 5.0中で37 °Cで1時間インキュベートし、その後5 mM EDTAを含む50 mMグリシン緩衝液pH 10.4を添加して酵素活性を阻害した。マルチスキャン MCC/340マイクロプレートリーダー(Multiskan MCC/340 microplate reader)によって405 nmの吸光度を測定した。

#### 【0042】

細胞接着活性の指標として細胞面積を決定するため、4 x 10<sup>4</sup>細胞を48穴プレート中の基質に添加した。接着した細胞を8%グルタルアルデヒド(Sigma)で固定し、20%メタノール中の0.25%クリスタルバイオレット(Sigma)で染色した。細胞面積の測定は、イメージプロプラスソフトウェア(Image-Pro plus software)(Media Cybernetics)によって行なった。各実験では1部位につき200または300の測定を3回繰り返して行なった。データは特定の時点における平均面積 ± 平均の標準誤差として報告する。

#### 【0043】

図3に示すように、 igh3-WTおよび igh3-RGDを用いた細胞接着および伸長活性の測定の結果では、 igh3-WTに接着したHCE細胞の数および表面積の方が、陰性対照であるアルブミンに接着したものより明らかに大きく、フィブロネクチンに接着した細胞と同程度だった。図4Aおよび4Bに示すように、 ig-h3の細胞接着および伸長活性は、濃度依存性であった。RGDモチーフを欠失している ig-h3 RGDは、細胞の接着および伸長を支持する点で同等に有効だった(図5Aおよび5B)。これらの結果を合わせると、 ig-h3がRGDモチ

10

20

30

40

50



ーフには依存せずに細胞接着および伸長を支持することが確認される。

#### 【0044】

実験例1: ig-h3の細胞接着活性に関与する ig-h3の細胞表面受容体の同定

1-1: マトリックスペプチドおよび試薬を用いた細胞接着活性の同定

ig-h3蛋白質の細胞接着活性に関与する細胞表面受容体を同定するために、種々の試薬を用いた阻害アッセイ法が行われた。

#### 【0045】

まず、プラスチックの培養皿に10  $\mu$ g/mlフィブロネクチン、 igh3-WT、または igh3-RGDがコーティングされた。HCE細胞を5 mM EDTA、100  $\mu$ g/ml igh3-WT、100  $\mu$ g/ml ig h3- RGD、1 mM RGD、1 mM RGEまたは100  $\mu$ g/mlフィブロネクチンを含むまたはそれらを いずれも含まない培地中で30分間あらかじめインキュベートし、実施例1のように細胞接着についてアッセイした。

#### 【0046】

ig-h3の細胞接着は、 ig-h3自体、RGDペプチドおよびEDTAで著しく阻害され、フィブロネクチンおよびEGTAで部分的に阻害されたが、RGEペプチドでは阻害されなかった。図6Aに示すように、フィブロネクチンに対する細胞接着も、フィブロネクチン自体、RGDペプチドおよびEDTAで著しく阻害され、 ig-h3およびEGTAで部分的に阻害されたが、RGEペプチドでは阻害されなかった。これらの結果は、 ig-h3の細胞接着活性に関与している ig-h3の細胞表面受容体が、RGD依存性インテグリンの1つである可能性を示す。

#### 【0047】

1-2: 細胞接着活性に対する2価陽イオンの効果

ig-h3の仲介する接着の2価陽イオンに対する感受性を分析するために、細胞を2  $\times 10^5$  細胞/mlの濃度でHEPES緩衝生理食塩水(HBS)(150 mM NaCl、25 mM HEPES、2 mM EDTA、pH 7.4)に懸濁し、37  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その後、HBSで2度洗い、同じ緩衝液に再懸濁した。その後、細胞の一部(50  $\mu$ l)をマイクロプレートウェルに添加し、最終濃度の2倍の濃度の2価陽イオン( $MnCl_2$ 、 $MgCl_2$ または $CaCl_2$ )を含むHBSアリコート 50  $\mu$ lと、加湿した5%  $CO_2$ 大気中で、37  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。続いて、これをリガンドでコーティングした皿に播き、接着アッセイ法を行なった。

#### 【0048】

図6Bに示すように、 ig-h3への細胞接着は、 $Mn^{2+}$ で強く促進され、程度は落ちるが $Mg^{2+}$ で促進されるが、 $Ca^{2+}$ ではわずかに促進されるのみだった。これらを合わせると、この結果は ig-h3の細胞表面受容体が、 ig-h3との相互作用に2価陽イオンを必要とするRGD依存性インテグリンの一種であることを示す。

#### 【0049】

1-3: インテグリンに対するモノクローナル抗体を用いた ig-h3の細胞表面受容体の同定

ig-h3の受容体を同定するために、インテグリンのサブユニットの機能を阻害するモノクローナル抗体の、 ig-h3でコーティングされた表面へのHCE細胞の接着に対する効果を検討した。このため、まず、HCE (3  $\times 10^5$  細胞/ml)を、種々のインテグリンに対するモノクローナル抗体(5  $\mu$ g/ml)の各々の存在下で、インキュベーション溶液中で、37  $^{\circ}$ Cで30分間あらかじめインキュベートした。あらかじめインキュベートされた細胞を、 ig-h3蛋白質であらかじめコーティングされたプレートに移し、さらに37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、ヘキソサミニダーゼ基質に結合する ig-h3の定量分析を行なった。値は、モノクローナル抗体の非存在下で ig-h3に接着する細胞数に対する割合で示される。

#### 【0050】

ig-h3でコーティングされた表面への接着は、3サブユニットに対する抗体によって、特異的に阻害された。インテグリン 3サブユニットは、インテグリン 1サブユニットとカップルすることが知られているので、図6Cに示すように、抗 1抗体は ig-h3に対する細胞接着を著しく阻害した。HT1080細胞を用いても、同様な結果が観察された。

#### 【0051】

機能阻害抗体の対照実験として、フィブロネクチン、ピトロネクチン、ラミニン、および

10

20

30

40

50

I型コラーゲンが基質として用いられた。HCE細胞はインテグリンサブユニットに対する機能阻害モノクローナル抗体とあらかじめインキュベートし、10 µg/mlフィブロネクチン、ビトロネクチン、I型コラーゲン、またはラミニンでコーティングされたウェルに移した。インキュベーション後、接着した細胞数が分析された。

#### 【0052】

フィブロネクチンに対する細胞接着は、インテグリン 3および 5に対する抗体で、明らかに阻害された。図6Dに示すように、ビトロネクチンおよびI型コラーゲンへの接着は、それぞれインテグリン vおよび 2に対する抗体で阻害されたが、ラミニンに対する細胞接着は、インテグリン 3および 6に対する抗体で阻害された。一方で、1インテグリンに対する抗体は、上述の全てのリガンドに対する細胞接着を効果的に阻害した。

10

#### 【0053】

別の対照実験として、5インテグリンは発現するが3インテグリンは発現しないことが既知のK562細胞が使用された。K562細胞を、igh3-WT、フィブロネクチン、ラミニン、またはI型コラーゲンでコーティングされたプレートに播き、1時間インキュベートした後、ヘキソサミニダーゼ分析を行なった。K562細胞は ig-h3には接着しなかったが、フィブロネクチンとビトロネクチンには接着した。これらの結果を合わせると、図6Eに示すように、インテグリン 3 1はHCE細胞において ig-h3の特異的な受容体であることが示唆される。

#### 【0054】

実施例2: ig-h3の細胞接着活性に必須のドメインの同定

20

ig-h3の細胞接着活性を付与する必須のアミノ酸を同定するために、各繰り返しドメインが細胞接着を仲介する能力があるか決定するために調べた。

#### 【0055】

4つの繰り返しドメインにそれぞれ対応する4つの組換え蛋白質が調製された：図7のように、アミノ酸129～241位、237～377位、368～506位、および498～637位をそれぞれコードしている4つの ig-h3 cDNA断片をPCRで増幅し、pET-29b (+)のEcoRV-XhoI部位にクローニングし、得られた4つの発現ベクターp ig-h3 D-I、p ig-h3 D-II、p ig-h3 D-III、およびp ig-h3 D-IVを用いて、組換え蛋白質が調製された。発現ベクターp ig-h3 D-IIおよびp ig-h3 D-IVによる大腸菌形質転換体は、大腸菌BL21/His -gおよび大腸菌BL21/His -eと命名され、それぞれ受託番号KCTC 0905BPおよびKCTC 0904BPとして、韓国バイオサイエンス・バイオテクノロジー研究所 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) (KRIBB)のコリアンコレクションフォータイプカルチャー (Korean Collection for Type Culture) に2000年12月4日に寄託された。

30

#### 【0056】

組換え蛋白質 ig-h3 D-I、ig-h3 D-II、ig-h3 D-III、および ig-h3 D-IVの発現および精製は、実施例1-1に記述される手順に従い、図8に示すようにSDS-PAGEで同定された。

#### 【0057】

図9に示すように、細胞接着の仲介に関して、第2および第4 fas-1ドメインは野生型 ig-h3と比較して同様に活性であるが、第1のfas-1ドメインは弱く、第3のfas-1ドメインは全く活性を持たなかった。

40

#### 【0058】

インテグリンサブユニットに対する機能阻害抗体を用いた実験では、図10に示すように、第2および第4 fas-1ドメインに仲介される細胞接着のいずれも、3および 1インテグリンに対する抗体でほぼ完全に阻害され、これは第2および第4 fas-1ドメインの両方が、3 1インテグリンとの相互作用に必須のアミノ酸を持つことを示唆する。第1および第3ドメインはH1またはH2配列を持つが、細胞接着活性は持たないので、これらの結果はまた、H1配列もH2配列も ig-h3の細胞接着活性を仲介しないという結論を支持する。

#### 【0059】

実施例3: ig-h3の細胞接着に必須の保存されたアミノ酸配列の同定

50

### 3-1: アミノ酸配列のアライメントによる、保存されたモチーフの同定

独立して細胞接着を示す igh-h3の第2および第4 fas-1ドメインにおける細胞接着を担うアミノ酸配列を見つけるために、igh-h3の繰り返しfas-1ドメイン間のみならず、他の蛋白質のfas-1ドメイン間の相同性に基づくコンピュータ検索が行われた。その結果、図11に示すように、H2領域の近くの2つのアミノ酸、アスパラギン酸およびイソロイシンが、種々の蛋白質間で高度に保存されていることが分かった。さらに、アスパラギン酸およびイソロイシンは、いずれも高度な細胞接着活性を持つ igh-h3の第2および第4 fas-1ドメイン中で保存されているが、中程度の細胞接着活性を示す第1 fas-1ドメインではアスパラギン酸しか保存されていないことが分かった。細胞接着活性を示さない第3 fas-1ドメインは、2つのアミノ酸のいずれも持たない。この事実は、さらにH2領域近くのアスパラギン酸およびイソロイシン残基が、細胞接着および伸長活性の仲介には不可欠であるという根拠となる。

10

【0060】

### 3-2: 置換変異体を用いた保存されたアミノ酸配列の細胞接着活性の同定

2つのアミノ酸が細胞接着に必須であることをさらに確認するために、igh-h3の第4 fas-1ドメインを含む組換え蛋白質に、図12に示すように置換によって変異を導入した。igh-h3 D-IVの置換変異体をPCRによって調製し、塩基配列決定で配列を確認した。変異蛋白質は、実施例1-1と同様に単離および精製し、図13に示すようにSDS-PAGEで確認した。

【0061】

igh3 D-IVのPro616、Asp617およびIle618が組み合せてそれぞれSer、AlaおよびSerで置換されている変異蛋白質の細胞接着活性が調べられた。Asp617の代わりにAlaを持つD617A (igh3 D-IV-Pal)と命名された変異蛋白質、およびIle618の代わりにSerを持つI618S (igh3 D-IV-PDs)と命名された変異蛋白質は、細胞接着を著しく阻害したが、Pro616の代わりにSerを持つP616S (igh3 D-IV-sDI)と命名された変異蛋白質は、細胞接着活性に影響がないことがわかった。3つのアミノ酸が変異しているP616S/D617A/I618S (igh3 DIV-sas)と命名された変異蛋白質も、図14に示すように、細胞接着を阻害した。

20

【0062】

Asp617およびIle618に変異のある第1 fas-1ドメインにおいて、第1 fas-1ドメインを介した細胞接着活性がほぼ完全に失われたことは、617番目の位置のアスパラギン酸および618番目の位置のイソロイシンが、igh3の細胞接着活性の仲介に非常に重要なことを証明した。

30

【0063】

### 実施例4: 創傷治癒をもたらす igh3ドメインの同定

#### 4-1: 組換え igh3蛋白質の発現および精製

細胞接着において活性のある igh-h3ドメインのみで、4つ全てのfas-1ドメインを含む天然型 igh-h3のような創傷治癒機能を示すかどうかを調べるため、図15に示すような種々の組換え igh3蛋白質が調製された: 4つのfas-1ドメインを全て含むHis-<sup>-</sup>b; 第4ドメインのみを含む igh3-D-IV; および各々少なくとも1つの第4ドメインを含む igh3-D-IV、igh3-D-IV 2X、igh3-D-IV 3Xおよび igh3-D-IV 4X。実施例1で調製された igh3-WTと同じ細胞接着活性を示す組換え igh-h3蛋白質His-<sup>-</sup>bは、組換え発現ベクターpET-29 から、そのEcoRV-EcoRI部位に igh-h3 cDNAからあるアミノ末端領域を削除して得られたAsp718-BglII断片を結合して、調製された。組換え蛋白質His-<sup>-</sup>bおよび igh3-D-IVは、実施例1-1および実施例3と同様にして発現および精製された。

40

【0064】

igh3-D-IV、igh3-D-IV 2X、igh3-D-IV 3Xおよび igh3-D-IV 4Xのように少なくとも1つの第4ドメインを含む組換え蛋白質は、以下のように調製された。第4ドメインに対応するアミノ酸498~637位をコードするDNA断片をPCRで調製し、このPCR産物をクレノウ酵素によって平滑末端にした。この平滑末端cDNA断片を igh-h3の第4ドメインを含むp igh-h3 D-IVのEcoRV部位に挿入し、得られた発現ベクターをp igh-h3 D-IV 2Xと命名した。p igh-h3 D-IV 2Xの挿入断片はEcoRVおよびXhoIによる消化によって切り出し、クレノウ

50

処理で平滑末端にし、この平滑末端断片をp ig-h3 D-IVおよびp ig-h3 D-IV 2XのEcoRV部位に挿入した。得られた発現ベクターはp ig-h3 D-IV 3Xおよびp ig-h3 D-IV 4Xと命名された。全ての組換え蛋白質の発現は、1 mM IPTGの存在下で3時間誘導され、Ni-NTA樹脂 (Qiagen) を用いて単離された。単離された組換え蛋白質は、50 mM NaClおよび300 mM イミダゾールを含む20 mMトリス塩酸によって溶出して精製した。図16Aに示すように、ig-h3 D-IV 2X、 igh3-D-IV 3Xおよび igh3-D-IV 4Xは、4つの全てのドメインを含むig-h3組換え蛋白質とは異なり、可溶性の形態で合成され、変性を受けないので、大量に生成可能である。図16Bに示すように、非変性ゲルを用いた電気泳動では、ig-h3 D-IVはポリマーを形成しないが、2Xは部分的にポリマーを形成し、3Xおよび4Xはそれぞれ簡単にポリマーを形成することが分かった。

10

## 【 0 0 6 5 】

ig-h3の第4ドメインを4つ含む発現ベクターp ig-h3 D-IV 4Xを持つ大腸菌BL21/His-e4Xは、受託番号KCTC 0906BPとして、韓国バイオサイエンス・バイオテクノロジー研究所 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) (KRIBB)のコリアンコレクションフォータイプカルチャー (Korean Collection for Type Culture) に2000年12月4日に寄託された。

## 【 0 0 6 6 】

陽性対照のフィブロネクチンは、ラットクエン酸血漿から、ゼラチン-セファロース4Bを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。血漿は非置換セファロース4Bから室温で濾過され、溶出液は0.05 M EACA ( アミノカプロン酸 )、0.02 Mクエン酸ナトリウム、および0.02%アジ化ナトリウムを含む0.05 Mトリス塩酸で平衡化したゼラチンセファロース4Bに添加した。溶出後、大部分の血漿蛋白質は、1 M塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗い出された。その後、吸収されたフィブロネクチンは3 M尿酸等張緩衝液で溶出し、その後、これをPBS、pH 7.2に対して約48時間透析してフィブロネクチンを精製した。濃度は280 nmのUV吸光度で決定し、凍結乾燥してから-20 で保存した。

20

## 【 0 0 6 7 】

## 4-2: 第4ドメインを含む ig-h3 D-IVの創傷治癒活性の測定

天然型 ig-h3蛋白質のように4つのfas-1ドメイン全てを含む組換え ig-h3蛋白質His-bと、第4ドメインのみを含む組換え ig-h3蛋白質 igh3-D-IVの創傷治癒活性を比較するために、組換え蛋白質を含む軟膏基剤が以下のように試験された。

30

## 【 0 0 6 8 】

各々直径が2 cmの4つの真皮層全体の創傷を、ラットの背中に作製し、塗布される軟膏によって試験群1-A、1-B、1-Cおよび1-Dに分割した。

## 【 0 0 6 9 】

1-A: 物質と混合しない軟膏基剤を1日1 gmの用量でコーティングした。

## 【 0 0 7 0 】

1-B: フィブロネクチンが100 µg/mlの濃度で基剤と混合された軟膏を1日1 gmの用量でコーティングした。

## 【 0 0 7 1 】

1-C: His-b蛋白質が100 µg/mlの濃度で基剤と混合された軟膏を1日1 gmの用量でコーティングした。

40

## 【 0 0 7 2 】

1-D: igh3-D-IV蛋白質が100 µg/mlの濃度で基剤と混合された軟膏を1日1 gmの用量でコーティングした。

## 【 0 0 7 3 】

エーテル麻酔したラットの背中を刈り込み、ベタジン溶液で刈り込んだ領域を滅菌した。試験群1では、各ラットの背中をNo.15の外科用ナイフを用いて切り、真皮層全体を貫通する直径2 cmの4つの円形の創傷を作製した。試験群1-A、1-B、1-Cおよび1-D用の軟膏を創傷に約1 gの量で塗布し、これを合成ドレッシング (テガダーム (Tegaderm) 3M (登録商標)) で覆い、軽く包帯を当てた。軟膏の塗布は、毎日行なった。

50

## 【0074】

各軟膏には、水性物質（SamA基剤）と共に、1 gあたり、鯨蠟38 mg、ステアリルアルコール116 mg、ポリエチルグリコール38 mg、濃縮グリセリン192 mg、エタノール23 mg、ラウリル硫酸ナトリウム mg（??）、エチルパラオキシベンゾエート0.87 mg、ブチルパラオキシベンゾエート0.12 mg、および精製水が含まれていた。

## 【0075】

まず、創傷の形態が観察された。各創傷の近くに同一のものさしを置き、各創傷から同一の距離で写真を撮影した。写真はコンピュータでスキャンし、NIHイメージ解析システム（Bio-Optics）を用いて創傷の面積の測定に用いた。写真をとるために、ラットをエーテル麻酔し、筋肉を完全に弛緩させた。測定は22日目まで、1日おきに1回行なった。試験群間の比較のために、ANOVA検定およびシェファード（Scheffer）検定にしたがって、測定値を解析した。

## 【0076】

全ての試験群において、創傷面積は創傷の形成直後から次第に低下した。フィブロネクチンおよび組換え ig-h3蛋白質が塗布された試験群では、軟膏基剤のみが塗布された試験群よりも創傷面積が早く低下した。軟膏塗布の7日目以降に、創傷面積に有意差が見られた。統計的には、I-A群間および他の群間に、有意差（ $p < 0.05$ ）が見られたが、それらの群の間では、有意差は見られなかった。結果を以下の表1および図17に示す。

## 【0077】

## 【表1】

組換え ig-h3蛋白質と混合した軟膏基剤の創傷に対する治癒効果

群	日数											
	0	2*	4	6	8*	10*	12	14	16	18	20	22
I-A (対照)	3.15 $\pm 0.49$	3.09 <sup>a</sup> $\pm 0.31$	2.45 $\pm 0.39$	2.17 $\pm 0.46$	1.64 <sup>a</sup> $\pm 0.50$	1.80 <sup>a</sup> $\pm 0.11$	0.84 $\pm 0.32$	0.56 $\pm 0.31$	0.34 $\pm 0.07$	0.19 $\pm 0.04$	0.17 $\pm 0.05$	0.08 $\pm 0.01$
I-B (フィブロネクチン)	3.17 $\pm 0.78$	2.38 <sup>b</sup> $\pm 0.55$	2.01 $\pm 0.54$	1.83 $\pm 0.42$	1.39 <sup>b</sup> $\pm 0.38$	1.26 <sup>b</sup> $\pm 0.18$	0.54 $\pm 0.11$	0.39 $\pm 0.12$	0.25 $\pm 0.12$	0.16 $\pm 0.09$	0.12 $\pm 0.09$	0.06 $\pm 0.03$
I-C (His- $\beta$ -b)	3.14 $\pm 0.46$	2.58 <sup>b</sup> $\pm 0.47$	1.89 $\pm 0.26$	1.71 $\pm 0.33$	1.42 <sup>b</sup> $\pm 0.45$	1.37 <sup>b</sup> $\pm 0.71$	0.46 $\pm 0.06$	0.36 $\pm 0.13$	0.26 $\pm 0.09$	0.15 $\pm 0.10$	0.11 $\pm 0.03$	0.03 $\pm 0.01$
I-D (Big-h3-D-IV)	3.15 $\pm 0.43$	2.62 <sup>b</sup> $\pm 0.52$	2.37 $\pm 0.45$	1.98 $\pm 0.52$	1.51 <sup>b</sup> $\pm 0.21$	0.98 <sup>b</sup> $\pm 0.69$	0.44 $\pm 0.24$	0.22 $\pm 0.09$	0.20 $\pm 0.09$	0.18 $\pm 0.10$	0.13 $\pm 0.07$	0.06 $\pm 0.01$

値：平均  $\pm$  標準偏差

\*：ANOVAおよびシェファード検定で $p < 0.05$

a, b：垂直的に統計的有意差のあるデータ

## 【0078】

組織学的分析は、光学顕微鏡下で行なった。創傷部位の生検は、3日目、7日目、10日目、14日目および20日目に採取し、10%ホルマリンで固定し、パラフィンで固めた。サンプルの6  $\mu$ mの切片をヘマトキシリン-エオシン（H&E）およびマッソン3色染色法で染色してから顕微鏡で観察した。各試験物質の時間による創傷治癒効果は、再上皮化および膠原線維の形成で評価した。再上皮化については、上皮層がない場合をゼロ、上皮化の開始を1+、不完全な上皮層構造を2+、完全な上皮層構造を3+として、上皮の形成を半定量化した。試験群間の比較および各群内での時間による差については、ANOVA検定およびシェファード検定を用いて、測定値を統計的に解析した。膠原線維の形成については、3色染色で膠原線維の形成があまり観察されない場合に1+、膠原線維がまばらに形成されている場合に2+、密な膠原線維が観察されれば3+と等級付けした。

## 【0079】

光学顕微鏡観察では、再上皮化は試験群I-B、I-C、およびI-Dでは7～10日目に開始し、20日に完了した。これに対して対照群I-Aでは、再上皮化は14日でもまだ開始しておらず、20日には完了していない。結果を以下の表2および図18に示す。

## 【0080】

10

20

30

40

50

【表 2】

## 創傷の再上皮化

群	日数				
	3	7	10	14	20
1-A (対照)	0	0	0	0	2+
1-B (フィブロネクチン)	0	1+	1+	2+	3+
1-C (His- $\beta$ -b)	0	0	1+	2+	3+
1-D ( $\beta$ igD-IV)	0	0	1+	2+	3+

10

## 【0081】

膠原線維形成の結果を以下の表3に示す。表3に見られるように、試験群1-Aおよび1-Dでは、7日目まで等級+1が継続し、膠原線維はあまり形成されていないが、試験群1-Bおよび1-Cでは2+となっている。しかし、10日目には全ての試験群で2+となり、比較的豊富な膠原線維が見られた。図19に示すように、14日目には、膠原線維が密に形成され、きちんと配列されていた。当然、膠原線維がより密であれば、創傷治癒過程が改善していることを意味する。

## 【0082】

【表 3】

## 創傷における膠原線維の形成挙動

20

群	日数				
	3	7	10	14	20
1-A (対照)	1+	1+	2+	3+	3+
1-B (フィブロネクチン)	1+	2+	2+	3+	3+
1-C (His- $\beta$ -b)	1+	2+	2+	3+	3+
1-D ( $\beta$ igD-IV)	1+	1+	2+	3+	3+

## 膠原線維の形成段階

0: なし

1+: あまりない

2+: まばらに形成

3+: 非常に密

30

## 【0083】

4-3: 少なくとも1つの第4ドメインを含む組換え蛋白質 igh3-D-IV、 ig-h3 D-IV 2X、 igh3-D-IV 3Xおよび igh3-D-IV 4Xの創傷治癒効果

第4ドメインのみを含む igh3-D-IVが創傷治癒に有効であるという知見に基づいて、創傷治癒活性をアッセイするために、第4ドメインをそれぞれ2重、3重および4重に含む igh3-D-IV 2X、 igh3-D-IV 3Xおよび igh3-D-IV 4Xが調製された。

## 【0084】

実施例1-2と同様にして、組換え蛋白質のHCE細胞接着活性をアッセイした。結果は図20に示されている。組換え蛋白質 ig-h3-D-IV、 ig-h3 D-IV 2X、 igh3-D-IV 3Xおよび igh3-D-IV 4Xは、すべてHCE細胞の接着の誘導に有効であることがわかった。

40

## 【0085】

組換え蛋白質の創傷治癒効果を調べるために、以下の実験を行なった。

## 【0086】

体重250~300 gmのSD (Sprague-Dawley) 系統のラットを、一定の温度および湿度で、標準的飼料を用いて飼育した。

## 【0087】

試験群2では、各ラットの背中に、真皮層全体を通る4つの円形創傷が形成され、関心のある材料と混合したキトサン基剤でコーティングされた。

50

2-A：キトサン基剤のみでコーティングした創傷

2-B：500  $\mu$ g/mlのフィブロネクチンと混合したキトサン基剤でコーティングされた創傷

2-E：500  $\mu$ g/mlの ig-h3 D-IV 3X蛋白質と混合したキトサン基剤でコーティングされた創傷

2-F：500  $\mu$ g/mlの ig-h3 D-IV 4X蛋白質と混合したキトサン基剤でコーティングされた創傷

#### 【0088】

キトサン基剤の複合物は、以下のように調製された。分子量600,000 Daの可溶性キトサン（ポリ(1-4) 2-アミノ-2-デオキシ- -D-グルカン）1 gを無菌蒸留水100 mlに溶解し、得られた1%溶液を2 mlずつ12穴のプレート（Corning、米国）に分注し、その後、1ウェルあたり100  $\mu$ gのゲンタマイシンを添加した。フィブロネクチン、 ig-h3 D-IV 3Xおよび ig-h3 D-IV 4Xは、濃度が500  $\mu$ g/mlになるように個々に添加し、-70 で凍結し、凍結乾燥機（Ilshin）で12時間凍結乾燥して円盤型の複合物を得た。

#### 【0089】

エーテル麻酔したラットの背中を刈り込み、刈り込んだ部分をベタジン溶液で滅菌した。真皮層全体を貫通する直径7 mmの4つの円形の創傷を各ラットの背中に形成した。創傷を試験群2-A、2-B、2-Eおよび2-Fに使用した複合物でそれぞれ覆い、テガダーム（登録商標）（3M）で覆って、軽く包帯を当てた。複合物は、3日ごとに新しいものに交換した。

#### 【0090】

実施例4-2のように、創傷治癒効果は創傷の外見によって評価した。

#### 【0091】

組換え蛋白質 ig-h3 D-IV 3Xまたは ig-h3 D-IV 4Xを含む複合物から、高い創傷治癒効果が得られた。

#### 【0092】

試験群2-Aの全てのラット、試験群2-Bの1匹、および試験群2-Eおよび2-F各々における2匹ずつを除いて、全てのラットは12日から15日目で創傷から完全に回復した。全ての創傷は、創傷の形成直後にサイズが縮小した。試験群2-Aでは、創傷面積は治癒期間全体にわたって、比較的ゆっくりと低下することが観察された。他の試験群では、創傷面積は最初の3日間に大きく低下し、9日目まで次第に低下し、その後、再び大きく低下した。創傷間の比較に注目すると、表4および図21に示されるように、試験群2-Aよりも、試験群2-B、2-E、および2-Fにおいて、15日間の全期間に大きな有意差（ $p < 0.05$ ）が見られた。

#### 【0093】

#### 【表4】

創傷面積の低下（ $\text{mm}^2$ ）

群	日数					
	0	3*	6*	9*	12*	15*
2-A (キトサン)	49.3 $\pm$ 4.0	34.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
2-B (キトサン+ フィブロネクチン)	49.2 $\pm$ 0.5	24.1 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	12.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	9.7 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
2-C (Chitosan+ $\beta$ ig-h3 3X)	49.2 $\pm$ 1.5	25.3 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	16.6 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	11.2 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	5.0 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
2-D (Chitosan+ $\beta$ ig-h3 4X)	48.5 $\pm$ 0.4	24.5 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	14.1 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	9.6 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	4.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

値：平均  $\pm$  標準偏差

+：ANOVA検定で $p < 0.05$

a, b：統計的有意差のあるデータ

#### 【0094】

したがって、 ig-h3の第2および第4ドメインを含む本発明の組換え蛋白質は、単独または組み合わせ、または複数で、細胞接着および創傷治癒に有効であり、究極的に細胞培養お

10

20

30

40

50

および創傷治癒剤の開発に用いることができる。

【0095】

産業への応用可能性

本発明では、インテグリンとの会合に必須であることが既知の1つのアスパラギン酸残基および1つのイソロイシン残基が高度に保存されている、 ig-h3の第2および第4ドメインを少なくとも1つ含む組換え蛋白質が提供される。また、組換え蛋白質自体は、細胞接着および創傷治癒に有用であり、細胞培養法および創傷治癒剤の開発に貢献できる。

【0096】

本発明は例証を挙げて説明されており、使用された用語は限定ではなくむしろ説明のためのものであると意図され、理解されるべきである。上記の開示を考慮すると、本発明の多くの修正または変法が可能である。したがって、添付の特許請求の範囲内で、本発明は具体的に記述された以外の方法で実施され得ることを理解されるべきである。



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する  
ブダペスト条約

国際様式

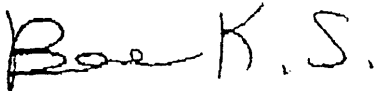
原寄託についての受託証

規則7.1に従い発行される

寄託者: KDM, In-San

Dongseotown 106-908, #1040, Maeho-dong, Soosung-ku, Daegu 706-140,  
Republic of Korea

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示：  <b><i>Escherichia coli</i></b> <b>BL21/His <math>\beta</math> -e</b>	国際寄託当局による受託番号：  <b>KCTC 0904BP</b>
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 [ x ] 科学的性質 [ ] 分類学上の位置 (あてはまるものにXをマークする)	
III. 受領および寄託	
本国際寄託当局は、2000年12月4日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受託した。そして、 年 月 日に原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称: Korean Collection for Type Cultures  あて名: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-333, Republic of Korea	国際寄託当局を代表する権限のある職員：   BAE, Kyung Sook, ディレクター 2000年12月7日

20

30

40

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する  
ブダペスト条約

国際様式

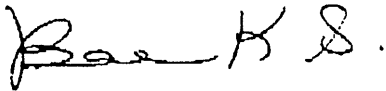
原寄託についての受託証

規則7.1に従い発行される

寄託者: KIM, In-San

Dongseotown 106-908, #1040, Maeho-dong, Soosung-ku, Daejeon 305-140,  
Republic of Korea

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示:  <b><i>Escherichia coli</i></b> <b>BL21/His <math>\beta</math>-g</b>	国際寄託当局による受託番号:  <b>KCTC 0905BP</b>
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p>[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 科学的性質</p> <p>[ <input type="checkbox"/> ] 分類学上の位置</p> <p>(あてはまるものにXをマークする)</p>	
III. 受領および寄託	
本国際寄託当局は、2000年12月4日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
<p>本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受託した。そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。</p>	
V. 国際寄託当局	
<p>名称: Korean Collection for Type Cultures</p> <p>あて名: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejeon 305-333, Republic of Korea</p>	<p>国際寄託当局を代表する権限のある職員:</p> <p></p> <p>BAE, Kyung Sook, ディレクター 2000年12月7日</p>

20

30

40

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する  
ブダペスト条約

国際様式

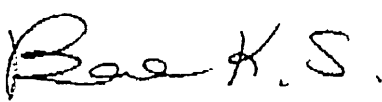
原寄託についての受託証

規則7.1に従い発行される

寄託者: KIM, In-San

Dongsentown 106-908, #1040, Maeho-dong, Soosung-ku, Daegu 706-140,  
Republic of Korea

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示：  <b><i>Escherichia coli</i></b> <b>BL21/His <math>\beta</math> -e4X</b>	国際寄託当局による受託番号：  <b>KCTC 0906BP</b>
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (あてはまるものにXをマークする)	
III. 受領および寄託	
本国際寄託当局は、2000年12月4日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受託した。そして、 年 月 日に原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称: Korean Collection for Type Cultures  あて名: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-333, Republic of Korea	国際寄託当局を代表する権限のある職員：   BAE, Kyung Sook, ディレクター 2000年12月7日

20

30

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> REGEN BIOTECH INC.  
 <120> METHOD FOR CELL ADHENSION AND WOUND HEALING  
 <130> WN-A0204  
 <140> JP 2001-583794  
 <141> 2000-12-08

50

<150> KR 2000/25662  
 <151> 2000-05-13  
 <160> 21  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> BIGH3\_HUMAN 10  
 <400> 1  
 Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile  
 20 25  
 <210> 2  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220> 20  
 <223> BIGH3\_PIG  
 <400> 2  
 Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile  
 20 25  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence 30  
 <220>  
 <223> BIGH3\_CHICK  
 <400> 3  
 Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Val His Val Ile Asp Lys Val Ile  
 20 25  
 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT 40  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> BIGH3\_HUMAN  
 <400> 4  
 Ile Asn Gly Lys Ala Ile Ile Ser Asn Lys Asp Ile Leu Ala Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Ile His Tyr Ile Asp Glu Leu Leu Ile  
 20 25  
 <210> 5  
 <211> 27 50

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> BIGH3\_PIG  
 <400> 5  
 Ile Asn Gly Lys Pro Ile Ile Ser Asn Lys Asp Val Leu Ala Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Ile His Phe Ile Asp Glu Leu Leu Ile  
 20 25  
 <210> 6 10  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> BIGH3\_CHICK  
 <400> 6  
 Leu Asn Gly Arg Ala Ile Ile Ala Asn Lys Asp Ile Leu Ala Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Val His Phe Val Asn Glu Leu Leu Ile  
 20 25 20  
 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> OSF2\_HUMAN  
 <400> 7  
 Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val Thr Asn Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile 30  
 20 25  
 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> OSF2\_MOUSE  
 <400> 8  
 Ile Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val Thr Lys Asn  
 1 5 10 15 40  
 Gly Val Ile His Leu Ile Asp Glu Val Leu Ile  
 20 25  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> BIGH3\_HUMAN  
 <400> 9  
 Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly 50

1	5	10	15	
Val Val His Val Ile Thr Asn Val Leu				
	20	25		
<210>	10			
<211>	25			
<212>	PRT			
<213>	Artificial Sequence			
<220>				
<223>	BIGH3_PIG			
<400>	10			10
Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Ala Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly				
1	5	10	15	
Val Val His Thr Ile Asn Thr Val Leu				
	20	25		
<210>	11			
<211>	25			
<212>	PRT			
<213>	Artificial Sequence			
<220>				
<223>	BIGH3_CHICK			20
<400>	11			
Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Ser Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly				
1	5	10	15	
Val Ile His Ala Val Ser Ser Val Leu				
	20	25		
<210>	12			
<211>	28			
<212>	PRT			
<213>	Artificial Sequence			
<220>				30
<223>	SLL1735 homolog			
<400>	12			
Val Lys Asn Ala Thr Val Leu Ala Ala Asp Ile Glu Ala Asp Asn Gly				
1	5	10	15	
Ile Ile His Val Ile Asp Asn Val Ile Leu Met Gly				
	20	25		
<210>	13			
<211>	28			
<212>	PRT			
<213>	Artificial Sequence			40
<220>				
<223>	SLL1735			
<400>	13			
Val Lys Asn Ala Thr Val Ile Ile Pro Asp Ile Glu Ala Asp Asn Gly				
1	5	10	15	
Ile Ile His Val Ile Asp Asn Val Ile Leu Met Gly				
	20	25		
<210>	14			
<211>	26			
<212>	PRT			50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SLL1483

<400> 14

Val Asn Lys Ala Thr Val Ile Ser Ala Asp Val Asp Ala Ser Asn Gly  
1 5 10 15

Val Ile His Val Ile Asp Gln Val Ile Leu  
20 25

<210> 15

<211> 25

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OSF2\_HUMAN

<400> 15

Val Asn Glu Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly  
1 5 10 15

Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu  
20 25

<210> 16

20

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OSF2\_MOUSE

<400> 16

Val Asn Glu Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly  
1 5 10 15

Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu  
20 25

30

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Midline Fasciclin

<400> 17

Ile Asn Asn Leu Ala Lys Ile Ile Asp Ala Asp Ile Met Gly Thr Asn  
1 5 10 15

Gly Val Leu His Val Ile Asp Thr Leu Leu  
20 25

40

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HLC-32

<400> 18

Ser Lys Ala Ser Arg Val Ile Leu Arg Asp Ile Pro Thr Thr Asn Gly  
1 5 10 15

50

Val Ile Gln Val Ile Asp Arg Val Ile Leu

20

25

<210> 19

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Midline Fasciclin

<400> 19

Lys Ile Glu Asn Ala Gly Val Thr Lys Cys Asp Val Val Ala Thr Asn

10

1

5

10

15

Gly Ile Leu His Glu Ile Asn Asp Ile Ile Val

20

25

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HLC-32

<400> 20

20

Thr Ala Asn Gly Ala Arg Val Val Glu Ala Asp Arg Lys Ala Ser Ser

1

5

10

15

Gly Leu Ile His Val Val Asp Lys Val Ile

20

25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> consensus

<400> 21

30

Val Asn Asn Ala Ala Arg Val Val Lys Ala Asp Ile His Ala Thr Asn

1

5

10

15

Gly Val Ile His Val Ile Asp Lys Val Leu Ile Met Gly

20

25

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 組換え蛋白質 igh3-WTおよび igh3- RGDを示す模式図であり、保存された領域は

□ および □ で、RGDモチーフは ⊗ で表される。

40

【図 2】 組換え蛋白質 igh3-WTおよび igh3- RGDのSDS-PAGEの結果を示す写真である。

【図 3】 クリスタルバイオレット染色の、組換え蛋白質 igh3-WTおよび igh3- RGDのHCE細胞接着および伸長効果を示す顕微鏡写真である。

【図 4】 組換え蛋白質 igh3-WTおよび igh3- RGDのHCE細胞の接着および伸長活性が、接着した細胞の数(A)および表面積(B)で測定したところ、濃度依存的であることがわかる曲線を示す。

【図 5】 組換え蛋白質 igh3-WTおよび igh3- RGDのHCE細胞接着活性を、接着した細胞の数(A)および表面積(B)について比較したヒストグラムを示す。

【図 6 A】 組換え蛋白質 igh3-WTおよび igh3- RGDのHCE細胞接着活性に対する種々

50



の化合物の効果を示すヒストグラムである。

【図 6 B】 組換え蛋白質 igh3-WTのHCE細胞接着活性に対する種々の2価の陽イオンの影響を示すヒストグラムである。

【図 6 C】 組換え蛋白質 igh3-WTのHCE細胞接着活性に対する抗インテグリンモノクローナル抗体の阻害効果を示すヒストグラムである。

【図 6 D】 種々の蛋白質のHCE細胞接着活性に対する抗インテグリンモノクローナル抗体の阻害効果を示すヒストグラムである。

【図 6 E】 組換え蛋白質 igh3-WTおよびマトリックス蛋白質へのK562細胞の接着特異性を示すヒストグラムである。

【図 7】 ig-h3のfas-1ドメインのそれぞれを持つ組換え蛋白質を示す模式図である。 10

【図 8】 ig-h3のfas-1ドメインを含む組換え蛋白質のSDS-PAGE結果を示す写真である。

【図 9】 ig-h3のfas-1ドメインを含む組換え蛋白質のHCE細胞接着活性を示すヒストグラムである。

【図 10】 ig-h3のfas-1ドメインを含む組換え蛋白質のHCE細胞接着活性に対する抗インテグリン抗体の阻害効果を示すヒストグラムである。

【図 11】 fas-1ドメインを含む種々のマトリックス蛋白質のアミノ酸配列の一部を示す。

【図 12】 ig-h3の第4ドメインの置換変異体を示す模式図である。

【図 13】 ig-h3の第4ドメインの組換え置換変異体のSDS-PAGE結果を示す写真である 20

【図 14】 ig-h3の第4ドメインの置換変異体の細胞接着活性を示すヒストグラムである。

【図 15】 ig-h3の第4ドメインを1コピー、2コピー、3コピー、および4コピー含む、組換え蛋白質 igh3-D-IV、 igh3-D-IV 2X、 igh3-D-IV 3X、および igh3-D-IV 4Xを示す模式図である。

【図 16】 10% SDS-PAGE (A)および8%非変性PAGE (B)で流した、Ni-NTAアガロース樹脂を用いて精製した組換え蛋白質 igh3-D-IV、 igh3-D-IV 2X、 igh3-D-IV 3X、および igh3-D-IV 4Xの写真を示す。

【図 17】 軟膏基剤単独(A)を塗布された、およびこの軟膏基剤とフィブロネクチン(B)、His- -b (C)、および ig-h3-D-IV (D)を合わせて塗布した創傷の光学写真を示す。 30

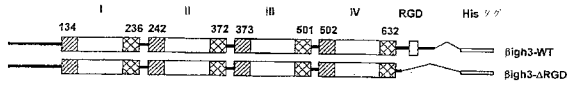
【図 18】 軟膏基剤単独(A)で治療された、およびこの軟膏基剤とフィブロネクチン(B)、His- -b (C)、および ig-h3-D-IV (D)を合わせて治療された後の、再上皮化の過程にある創傷の顕微鏡写真を示す。

【図 19】 軟膏基剤単独(A)で治療された、およびこの軟膏基剤とフィブロネクチン(B)、His- -b (C)、および ig-h3-D-IV (D)を合わせて治療された後に形成された膠原線維を持つ創傷の光学写真である。

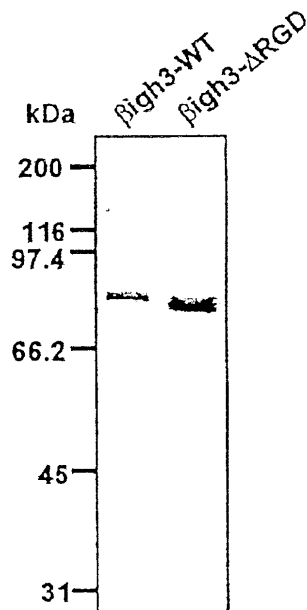
【図 20】 ig-h3の第4ドメインを少なくとも1コピー含む組換え蛋白質 igh3-D-IV、 igh3-D-IV 2X、 igh3-D-IV 3X、および igh3-D-IV 4XのHCE細胞接着活性を示すヒストグラムである。 40

【図 21】 キトサン基剤単独(A)で治療された、およびこの軟膏基剤とフィブロネクチン(B)、 ig-h3 3X (C)、および ig-h3 4X (D)を合わせて治療された後に面積が縮小した創傷の光学写真を示す。

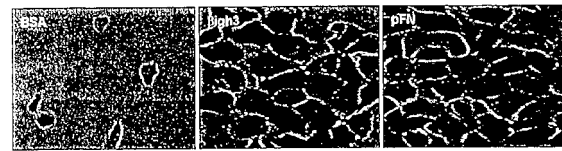
【図 1】



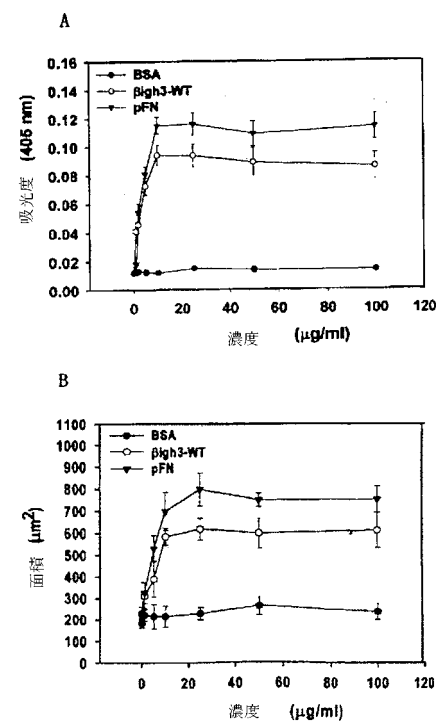
【図 2】



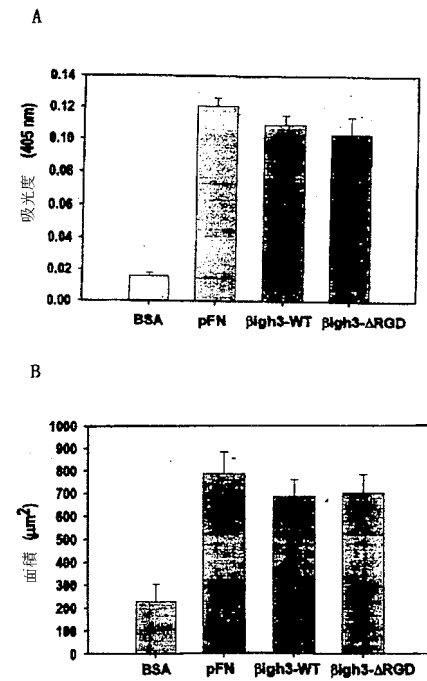
【図 3】



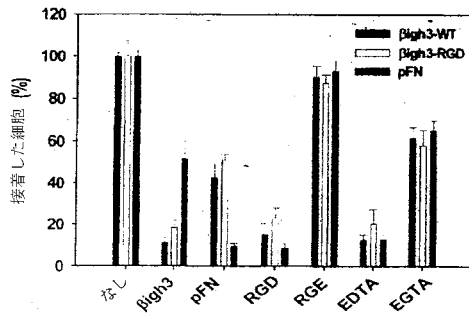
【図 4】



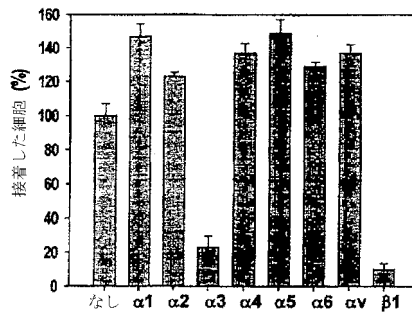
【図 5】



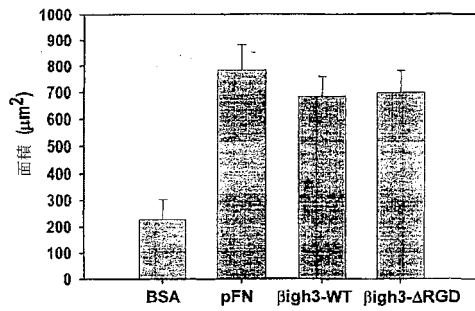
【図 6 A】



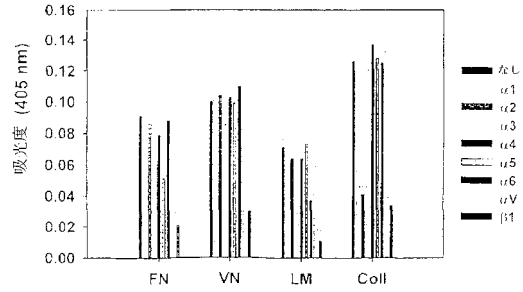
【図 6 C】



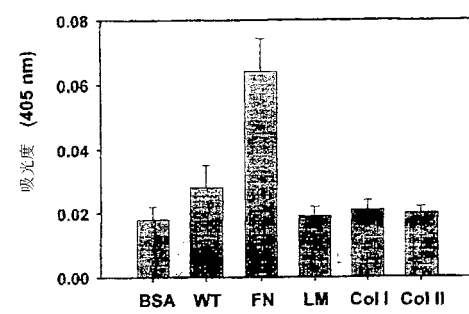
【図 6 B】



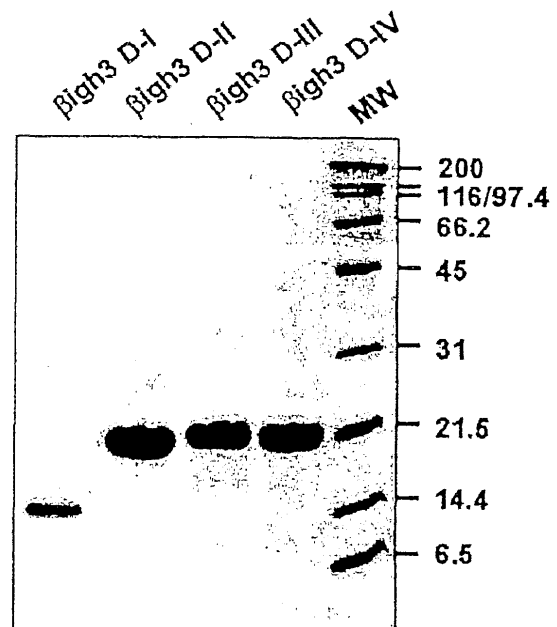
【図 6 D】



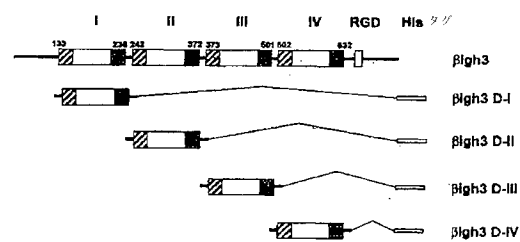
【図 6 E】



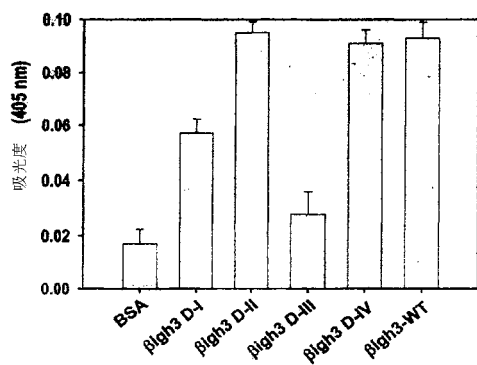
【図 8】



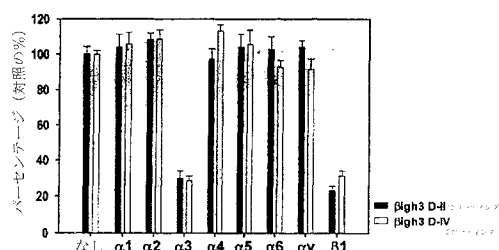
【図 7】



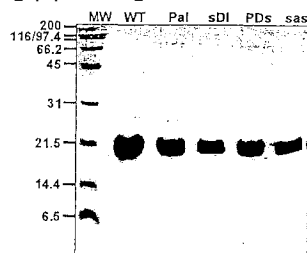
【図 9】



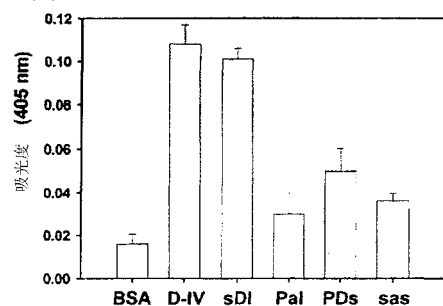
【図 10】



【図 13】



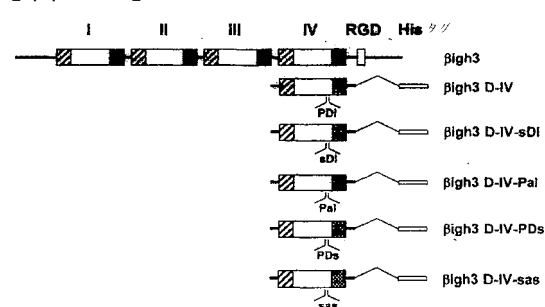
【図 14】



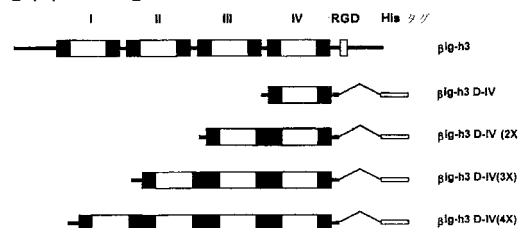
【図 11】

		12	
BIGH3 ヒト	211	TVNCA	LLKADH
BIGH3 プタ	211	TVNCA	LLKADH
BIGH3 ニフトリ	201	TVNCA	LLKADH
BIGH3 ヒト	346	INGKA	IIISNKD
BIGH3 プタ	346	INGKA	IIISNKD
BIGH3 ニフトリ	338	LNGRA	IIANKD
OSF2 ヒト	340	VNGIM	VNKKD
OSF2 マウス	342	INGIM	VNKKD
BIGH3 ヒト	608	VNKEP	VAE-P
BIGH3 プタ	608	VNKEP	VAE-P
BIGH3 ニフトリ	600	VNKEP	VAE-P
SLL1735 類似体	106	VKNAT	VLA-A
SLL1735	106	VKNAT	VLA-P
SLL1483	152	VNKAT	VIS-A
OSF2 ヒト	604	VNELK	SKE-S
OSF2 マウス	606	VNELK	SKE-S
正中脳ファシクリン	543	INNLA	KIIDAD
HLC-32	341	-SKAS	RVIIRD
正中脳ファシクリン	825	KIENAG	VTKCD
HLC-32	196	TANGAR	VVEAD
コンセンサス		VNNAARVVKADZHATNGVIHVDKVLING	

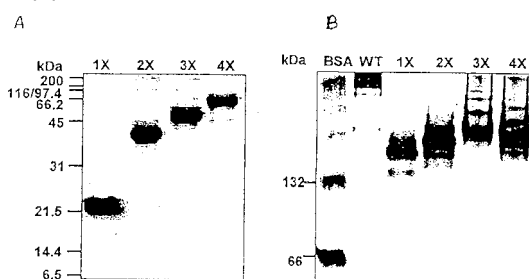
【図 12】




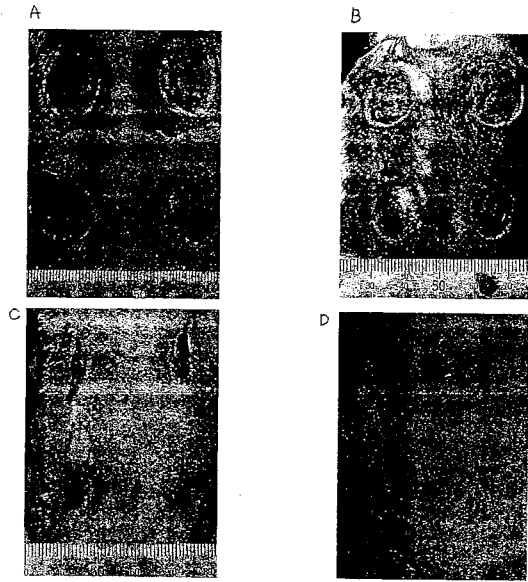
【図 15】




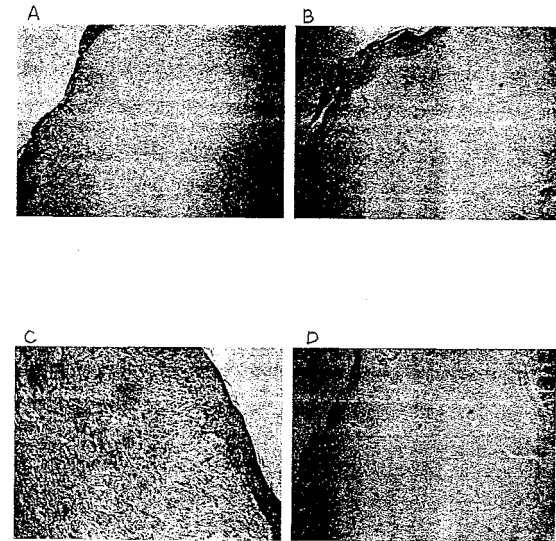
【図 16】




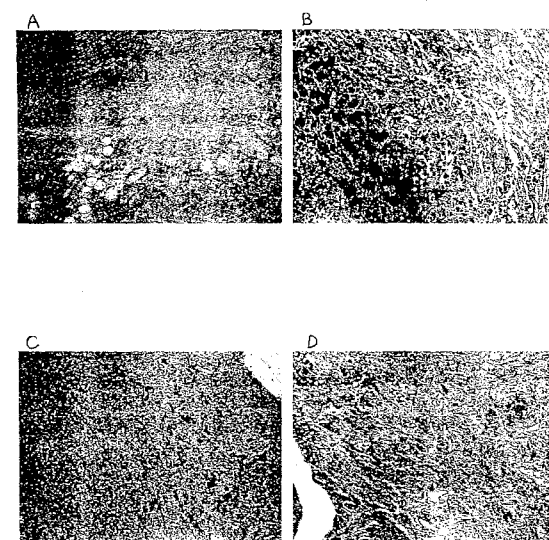
【 17】




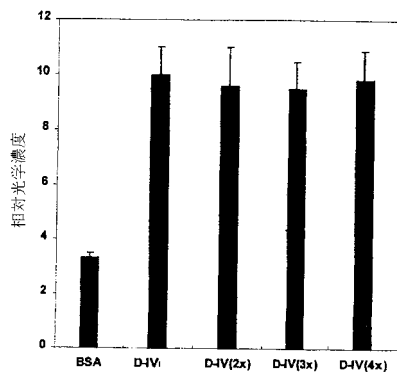
【 18】



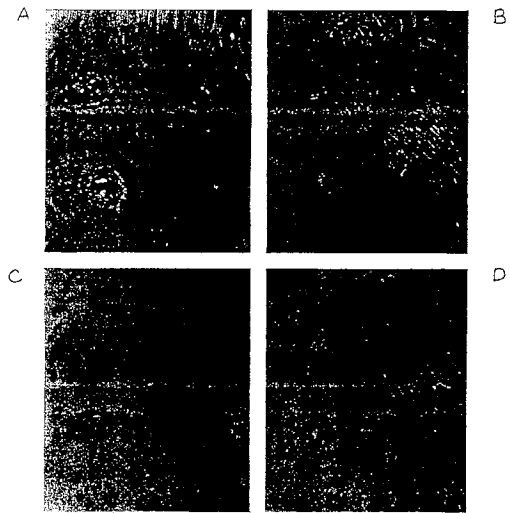
【 19】



【 20】



【図 21】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 E
C 0 7 K	14/78	(2006.01)	C 0 7 K 14/78
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00 C

(72)発明者 キム ジュン - コン  
大韓民国 テーグ ソーサング - ク ブムル - ドン オーバングチュンガ # 2 0 5 - 9 0 7

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開平 7 - 1 3 3 2 9 6 ( J P , A )  
国際公開第 9 6 / 0 1 1 0 2 ( W O , A 1 )  
J. Invest. Dermatol. , 1995, Vol. 104, No. 5, p. 844-9  
DNA Cell Biol. , 1992, Vol. 11, No. 7, p. 511-22

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N1/00-7/08  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)