(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4819364号
(P4819364)

(45)発行日　平成23年11月24日(2011.11.24)　(24)登録日　平成23年9月9日(2011.9.9)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 31/729	(2006.01)	A61K	31/729	
A61K 9/70	(2006.01)	A61K	9/70	405
A61K 47/02	(2006.01)	A61K	47/02	
A61L 26/00	(2006.01)	A61L	25/00	K
A61L 15/16	(2006.01)	A61L	15/01	

請求項の数 9　(全 26 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2004-564024 (P2004-564024)
(86)(22)出願日	平成15年12月22日 (2003.12.22)
(65)公表番号	特表2006-511586 (P2006-511586A)
(43)公表日	平成18年4月6日 (2006.4.6)
(86)国際出願番号	PCT/US2003/041183
(87)国際公開番号	WO2004/059318
(87)国際公開日	平成16年7月15日 (2004.7.15)
審査請求日	平成18年12月22日 (2006.12.22)
(31)優先権主張番号	60/436,046
(32)優先日	平成14年12月23日 (2002.12.23)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/436,027
(32)優先日	平成14年12月23日 (2002.12.23)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　505226389
ウイリアム、マーシュ、ライス、ユーニヴァーサティ
アメリカ合衆国テクサス州７７２５１－１８９２、ヒューストン、ピー・オウ・バックス　１８９２
(74)代理人　100073841
弁理士　真田　雄造
(72)発明者　ゴゥマ，リチァド
アメリカ合衆国テクサス州７７０８１、ヒューストン、ニューキャスル・＃２３１５４５４番
(72)発明者　ピリング，ダレル
アメリカ合衆国テクサス州７７５８４、ペアランド、デイ・ドライヴ　２２０６番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】線維細胞形成阻害の検出方法、ならびに線維細胞形成を増強する方法および化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

血清アミロイドＰ（ＳＡＰ）を結合することのできる高ＥＥＯアガロース（ＥＥＯ値０．２０～０．２６）と、カチオンとを含んでなり、該アガロースは哺乳動物において皮膚創傷の治癒を促進する機能を有し、該カチオンは該アガロースと協同して皮膚創傷の治癒を促進する機能を有し、該カチオンの濃度は該アガロース単独の場合よりも迅速に皮膚創傷の治癒を促進するに十分である、創傷包帯剤。

【請求項２】

前記カチオンは２価カチオンを含む、請求項１に記載の創傷包帯剤。

【請求項３】

前記カチオンがCa^{2+}を含む、請求項２に記載の創傷包帯剤。

【請求項４】

前記高ＥＥＯアガロース（ＥＥＯ値０．２０～０．２６）の量が１％（ｗ／ｖ）である、請求項１に記載の創傷包帯剤。

【請求項５】

追加の創傷治癒因子をさらに含む、請求項１に記載の創傷包帯剤。

【請求項６】

前記の追加の創傷治癒因子が、ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＦＧＦ、ＴＧＦβ、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項５に記載の創傷包帯剤。

【請求項７】

０．１～１０ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＬ－１３をさらに含む、請求項６に記載の創傷包帯剤。
【請求項８】
帯具をさらに含む、請求項１に記載の創傷包帯剤。
【請求項９】
前記高ＥＥＯアガロース（ＥＥＯ値０．２０～０．２６）が、ガラクトースのピルビン酸アセタールを含む、請求項１に記載の創傷包帯剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、単球から線維細胞への分化を抑制するＳＡＰの能力に関する。したがって、本発明は、そのような分化を増強するための組成物および方法を含む。それらの組成物および方法は、創傷治癒など、線維細胞の形成を増強することが有益な様々な適用例で有用となり得る。本発明は、さらに、単球の線維細胞への分化能力の問題またはＳＡＰがこの分化を抑制する問題を検出する方法を含む。これらの問題は、疾患と相互に関係していてもよいし、薬物によって誘発されたものでもよい。
【背景技術】
【０００２】
線維細胞
炎症は、組織外傷または感染に対する協調応答である。開始事象は、白血球遊走因子の局所での放出、血小板の活性化、ならびに凝集および補体経路の開始を媒介とする。これらの事象が局所内皮を刺激して、好中球および単球の血管外遊出を促進する。炎症の第二相は、リンパ球を含む適応免疫系細胞の組織への流入を特徴とする。その後の消散相は、過剰白血球のアポトーシスおよび組織マクロファージによる抱き込みが起こるときには、線維芽細胞などの間質細胞による組織損傷の修復も特徴とする。
【０００３】
ＩＬ－４およびＩＬ－１３は共に、線維性応答の強力な賦活物質である。ＩＬ－４は、創傷の修復および治癒を高めることが知られている。ＩＬ－１３は、ＩＬ－４との相同性が高く、多くの系でこれらは同様の働きをする。しかし、様々な状況において、これら２種のタンパク質の機能の重要な違いが発見された。例えば、ＩＬ－１３は、腸内線虫、およびリーシュマニアなどの細胞内寄生体による感染への抵抗時により優性となる。またＩＬ－１３は、喘息においてもＩＬ－４よりはるかに重要な役割を担う。対照的に、ＩＬ－４は、Ｂ細胞による免疫グロブリン産生の刺激およびＴ細胞の生存および分化においてＩＬ－１３よりも優性である。
【０００４】
ＴＧＦβは、これも創傷治癒で役割を担うことが知られているが、線維細胞の、創傷治癒とさらに関連のある筋線維芽細胞への分化を促進することがわかっている。
【０００５】
ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＴＧＦβ、および他の様々な因子が線維性応答で役割を担うことは知られているものの、創傷病巣の修復を司り、または他の線維性応答で役割をもつ線維芽細胞の供給源については議論の最中にある。従来の仮説では、局所の静止線維芽細胞が、患部に移動し、細胞外マトリックスタンパク質を産生し、創傷の収縮または線維化を促進することが示唆されている。もう１つの仮説は、血液内に存在する循環線維芽細胞前駆細胞（線維細胞と呼ぶ）が、外傷部位または線維化部位に遊走し、そこで分化し、組織修復および他の線維性応答を媒介するというものである。
【０００６】
線維細胞は、ＣＤ１４＋末梢血単球前駆体集団から分化することが知られている。線維細胞は、造血細胞（ＣＤ４５、ＭＨＣクラスＩＩ、ＣＤ３４）および間質細胞（コラーゲンＩ型およびＩＩＩ型、フィブロネクチン）の両方のマーカーを発現させる。成熟線維細胞は、組織外傷部位にすばやく侵入し、そこで炎症性のサイトカインを分泌する。そして

すぐに、線維細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）として機能し、それによって抗原特異的な免疫を誘発することができる。線維細胞は、創傷修復の助けとなり得る細胞外マトリックスタンパク質、サイトカイン、および血管原性前駆分子を分泌することもできる。

【０００７】

線維細胞は、他の様々な過程および障害とも関連している。線維細胞は、マウスにおける日本住血吸虫感染後の線維性病変の成立と関連しており、自己免疫疾患に随伴する線維症にも関与する。線維細胞は、放射線による損傷と関係のある病原性線維症、ライム病、および肺線維症とも関連付けられている。ＣＤ３４＋線維細胞は、膵炎および間質性線維症における間質の再構築とも関連付けられており、一方この種の線維細胞の欠乏は、膵臓腫瘍および腺癌と関連している。この相互関係は、線維細胞のＡＰＣとして機能できる能力と関連しているかもしれない。最後に、線維細胞は、内皮細胞に作用して血管形成を促進することがわかっている。

【０００８】

血清アミロイドＰ

線維細胞が役割を担う過程および疾患の範囲の広さを考えると、末梢血単球から線維細胞への分化を調節する機構は、非常に興味深いものである。本発明は、単球からの末梢血線維細胞への分化が、血清および血漿中の因子によって抑制されるという発見に基づく。ヒト血漿を分別すると、この因子が血清アミロイドＰ（ＳＡＰ）として同定された。ＳＡＰは、Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）を含む、タンパク質のペントラキシンファミリーのメンバーであり、肝臓によって分泌され、安定な五量体として血中を循環する。ＳＡＰの正確な役割は未だ不明であるが、免疫応答の開始相および消散相の両方で役割を担うと思われる。ＳＡＰは、細菌表面上の糖残基に結合し、そのオプソニン作用をもたらし、抱き込まれる。またＳＡＰは、免疫応答の消散時に、アポトーシス細胞によって生成される遊離のＤＮＡおよびクロマチンに結合し、そうして二次炎症性応答を防ぐ。ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）およびＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）が優先されるが、ＳＡＰが古典的Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）の３種すべてに結合できるために、ＳＡＰが結合した分子は、細胞外区域から除去される。受容体への結合後、ＳＡＰおよび結合相手の分子は、おそらくは細胞に抱き込まれる。

【０００９】

ＦｃγＲは、ＩｇＧが広範な造血細胞に結合するのに必要である。末梢血単球は、ＣＤ６４およびＣＤ３２を発現させ、組織マクロファージは、３種すべての古典的ＦｃγＲを発現させる。単球の亜集団もＣＤ１６を発現させる。

【００１０】

病原体に結合し、または免疫複合体の部分として結合したＩｇＧによって単球上のＦｃγＲがクラスターを形成すると、広範な生化学事象が開始される。受容体の集合に続く最初の事象は、一連のｓｒｃキナーゼタンパク質の活性化を含む。単球では、これらには、ｌｙｎ、ｈｃｋ、およびｆｇｒが含まれ、これらが、ＦｃγＲＩおよびＦｃγＲＩＩＩに関連するＦｃＲ－γ鎖のＩＴＡＭモチーフ上、またはＦｃγＲＩＩの細胞質ドメインのＩＴＡＭモチーフ上にあるチロシン残基をリン酸化する。リン酸化を受けたＩＴＡＭは、ｓｙｋを含む第２セットのｓｒｃキナーゼによって結合されることになる。ｓｙｋは、ＩｇＧに覆われた粒子に対する食作用にとって極めて重要であることがわかっている。しかし、非造血細胞中のｓｙｋの分布が広いこと、ならびにｓｙｋが、インテグリンおよびＧタンパク質共役型受容体の両方のシグナル伝達に関与するという証拠は、この分子が多くの機能を有することを示唆している。

【００１１】

ＳＡＰおよびＣＲＰはどちらも、食作用を増強し、様々な細胞上のＦｃγ受容体に結合する。ＣＲＰは、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）に高い親和性で結合し、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）に低い親和性で結合するが、ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）は結合しない。ＳＡＰは、ＦｃγＲＩおよびＦｃγＲＩＩ、特にＦｃγＲＩに優先的に、３種すべての古典的Ｆｃγ受容体に結合する。ＣＲＰのＦｃγＲへの結合についての各所見は一致していないが、Ｓ

ＡＰおよびＣＲＰはどちらも、Ｆｃ受容体に結合し、ＦｃγＲの結合と一致する細胞内シグナル伝達事象を開始することがわかっている。

【００１２】

ヒト血清では、男性は通常、約３２μｇ／ｍｌ＋／－７μｇ／ｍｌのＳＡＰを有し、１２～５０μｇ／ｍｌの範囲が正常である。女性は一般に、血清中に約２４μｇ／ｍｌ＋／－８μｇ／ｍｌのＳＡＰを有し、８～５５μｇ／ｍｌの範囲が正常である。ヒトの大脳脊髄液中には、男性では通常約１２．８ｎｇ／ｍｌ、女性では約８．５ｎｇ／ｍｌのＳＡＰが存在する。男性と女性のデータを合わせると、ヒト血清中の正常ＳＡＰレベルは、２６μｇ／ｍｌ＋／－８μｇ／ｍｌであり、１２～５５μｇ／ｍｌの範囲が正常である。（上記血清レベルは、平均＋／－標準偏差として示してある。）

【００１３】

ＳＡＰは、主にアミロイド症におけるその役割に関して研究されている。最近では、ＳＡＰを枯渇させ、それによってアミロイド症を治療するために、薬物Ｒ－１－（６－［Ｒ－２－カルボキシ－ピロリジン－１－イル］－６－オキソ－ヘキサノイル）ピロリジン－２－カルボン酸（ＣＰＨＰＣ）が開発された。しかし、この薬物は、全身に適用され、創傷治癒の処置には使用されておらず、あるいは他の局在性もしくは全身性の作用をもたないようである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１４】

本発明の態様は、ＳＡＰを枯渇させる際のアガロースの使用に関する。寒天は、以前から創傷包帯剤として使用されてきた。しかし、適切な化学部分を含んでおらず、または不適切に使用されているかもしれないので、このようなこれまでの創傷包帯剤で、ＳＡＰを枯渇させることができていたかどうかは不明である。とにかく、これらの以前からの創傷包帯剤には、付加的な創傷治癒因子が組み込まれていないと思われる。さらに、こうした包帯剤は、外面の創傷に対してのみ使用されていると思われる。最後に、これらの包帯剤は、精製されたＳＡＰ枯渇性化学物質が組み込まれてもいなければ、またはそのレベルが高められてもいないと思われる。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

本発明は、ＳＡＰを結合する組成物および方法を含む。ＳＡＰを結合することのできる組成物には、ＣＰＨＰＣ、β－Ｄ－ガラクトピラノースの４，６－ピルビン酸アセチル、ホスホエタノールアミン、および抗ＳＡＰ抗体もしくはその断片が含まれ得る。このような結合は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行ってもｉｎ　ｖｉｖｏで行ってもよい。

【００１６】

本発明は、試料中のＳＡＰレベルを低下させる組成物および方法も含む。試料は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにあってもｉｎ　ｖｉｖｏにあってもよい。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、試料は、生物体全体またはその一部を含んでよく、枯渇は、全身でもよいし、または臓器や創傷などの特定の区域に限定してもよい。組成物には、直接に供給されるもの、または、例えば導入遺伝子を発現させて試料中に生成されるものが含まれ得る。ＳＡＰを枯渇させることのできる組成物には、ＣＰＨＰＣ、β－Ｄ－ガラクトピラノースの４，６－ピルビン酸アセチル、ホスホエタノールアミン、および抗ＳＡＰ抗体もしくはその断片が含まれ得る。試料中のＳＡＰレベルは、その最初の産生を妨害し、または分解を促進して低下させてもよい。

【００１７】

本発明は、ＳＡＰ活性を抑制する組成物および方法も含む。抑制は、試料中で起こってもよいし、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行ってもｉｎ　ｖｉｖｏで行ってもよい。組成物には、試料に直接に供給される組成物、および導入遺伝子を発現させるなどして試料中に生成されるものも含まれる。これらの組成物は、ＳＡＰの生成を減少させ、ＳＡＰタンパク質が単球と相互に作用する能力を低下させ、ＳＡＰタンパク質が補助因子と相互に作用する能力

もしくはそのような補因子のレベルを低下させ、またＳＡＰのＦｃγＲへの結合を誘因とする経路など、単球中でＳＡＰによって誘発されるシグナル伝達を妨害することによって作用する。ＳＡＰ活性を抑制するように作用することのできる組成物としては、抗ＳＡＰ抗体およびその断片、特にＦｃ結合領域を標的とするものが挙げられる。

【００１８】

本発明はさらに、創傷領域中のＳＡＰを枯渇させ、または抑制して、創傷治癒を促進する方法および組成物を含む。組成物は、追加の創傷治癒因子を含んでいてもよい。本発明の特定の実施形態では、創傷治癒組成物としては、高ＥＥＯアガロース、ホスホエタノールアミンアガロース、またはＣａ$^{2+}$、ならびにこれらの組合せが挙げられる。これら組成物に、ＩＬ－１３、ＩＬ－４、ＴＧＦβなどのサイトカインを加えてもよい。

【００１９】

本発明のさらに別の態様は、単球にＩＬ－４、ＩＬ－１３、またはその種の組合せを供給して、線維細胞の生成を促進する組成物および方法に関する。単球は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにあってもｉｎ　ｖｉｖｏにあってもよい。ＩＬ－４およびＩＬ－１３は、外来供給源によって供給してもよいし、または内生を増大させてもよい。

【００２０】

最後に、本発明は、試料の、単球から線維細胞への分化を調節する能力を検出するためのアッセイを含む。一実施形態では、正常な単球を試料と共に供給する。試料は、正常なＳＡＰを含んでよい。試料は、創傷治癒障害患者などの患者に由来するＳＡＰまたは生物学的な体液を含んでいてもよいし、あるいは潜在的な薬物を含んでいてもよい。別の実施形態では、試料は正常なＳＡＰを含み、単球は、患者由来であり、異常なものでよい。どちらのタイプのアッセイでも、単球の線維細胞への分化に及ぼされる影響を正常な対照と比較して、正常なものと比べた、単球の分化の増加または減少を検出することができる。

【００２１】

以下の図は、本明細書の部分であり、本発明のある側面をさらに実証するために含まれる。本発明は、これらの図面の１種または複数を本明細書で提供する詳細な説明と合わせて参照することによってより深く理解することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２２】

線維細胞は、末梢血単球由来の線維芽細胞様細胞の特徴的な集団である。血清または血漿不在でＣＤ１４＋末梢血単球を培養すると、線維細胞に急速に分化するようになる。この過程は、通常は４８～７２時間以内に起こり、血清または血漿が存在すると抑制される。本明細書でさらに記載する実験によって、この抑制がＳＡＰによって引き起こされることが確定した。追加の実験では、単球を無血清培地で培養するとき、ＩＬ－４またはＩＬ－１３が存在すると線維細胞への分化が増強されることが確定した。

【００２３】

ＳＡＰの結合

本発明は、ＳＡＰを結合する組成物および方法を含む。組成物としては、ＣＰＨＰＣ、β－Ｄ－ガラクトピラノースの４，６－ピルビン酸アセチル、ホスホエタノールアミン、および抗ＳＡＰ抗体もしくはその断片を挙げることができる。これらの組成物は、精製された化学物質を含んでもよいし、または化学物質をアガロースなどのはるかに大きい化合物に結合してもよい。結合は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行ってもｉｎ　ｖｉｖｏで行ってもよい。

【００２４】

特定の実施形態では、ＳＡＰを、約１％ｗ／ｖの高ＥＥＯアガロースを含む組成物に結合することができる。この組成物は、Ｍｇ$^{+}$やＣａ$^{2+}$などのカチオンを含んでもよい。例えば、アガロースは、約５ｍＭのＣａＣｌ$_{2}$を含んでよい。

【００２５】

他の実施形態では、組成物は、単球からの線維細胞の生成を抑制する際に機能し得るＳＡＰの一部を標的とする抗体または抗体断片を含む。好例となる実施形態では、ＳＡＰの機

能性部分は、線維細胞の生成に対して影響を及ぼさない、ＣＲＰと配列相同性の関係にない領域から選択する。例えば、ＳＡＰのアミノ酸６５～８９（ＫＥＲＶＧＥＹＳＬＹＩＧＲＨＫＶＴＳＫＶＩＥＫＦＰ－配列番号１）は、ＣＲＰと相同でない。アミノ酸１７０～１８１（ＩＬＳＡＹＱＧＴＰＬＰＡ－配列番号２）および１９２～２０５（ＩＲＧＹＶＩＩＫＰＬＶ－配列番号３）も相同でない。さらに、２種のタンパク質間の単一アミノ酸によるいくつかの差異が知られており、機能の違いをもたらし得る。

【００２６】

ＳＡＰの枯渇

本発明の別の態様は、試料中のＳＡＰレベルを枯渇させる組成物および方法に関する。試料は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにあっても、ｉｎ　ｖｉｖｏにあってもよい。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試料としては、組織培養物、バイオリアクター、組織工学用足場材料、および生検材料が挙げられる。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、試料は、生物体全体を含んでも、または臓器や外傷部位などのその部分を含んでもよい。ｉｎ　ｖｉｖｏでの枯渇は、全身でもよいし、または臓器や創傷などの特定の区域に限定してもよい。

【００２７】

ＳＡＰを枯渇させる組成物には、試料に直接に供給されるものが含まれ得る。例えば、上記の結合剤はすべて、試料に直接供給することができる。それら結合剤は、どんな形態もしくは製剤にして供給してもよいが、試料の所望の成果をほとんど妨害しないものが好ましい。

【００２８】

ＳＡＰを枯渇させる組成物は、試料中で生成しても、または試料を含む生物体中で生成してもよい。例えば、抗ＳＡＰ抗体をコードしている導入遺伝子を試料に導入することができる。

【００２９】

最後に、その最初の産生を妨害し、またはその分解を促進して、ＳＡＰレベルを激減させることもできる。特定の実施形態では、ＳＡＰ産生を抑制する組成物を投与して、ｉｎ　ｖｉｖｏでＳＡＰレベルを激減させる。ＳＡＰは、主に肝臓で産生されるので、ＳＡＰ産生のｉｎ　ｖｉｖｏでの抑制は容易に実現されるはずであるが、全身性となる。ＳＡＰ産生を妨害する組成物は、ＳＡＰ産生を調節するシグナル伝達経路に対して作用することができる。

【００３０】

ＳＡＰ活性の抑制

本発明は、ＳＡＰ活性を抑制する組成物および方法も含む。抑制は、試料中で起こってもよいし、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで行ってもよい。組成物には、試料に直接供給される組成物、および試料中で生成する組成物も含まれる。このような組成物は、多くが、上述のＳＡＰ結合組成物である。特に、ＳＡＰ活性を抑制する組成物には、ＣＲＰとの相同性をもたない特定のＳＡＰ領域に結合させるために上述のように選択した抗体を含めることができる。抗体は、ＦｃγＲに結合するＳＡＰ領域を標的とするものでもよい。

【００３１】

ＳＡＰ活性を抑制する組成物は、ＳＡＰタンパク質が単球と相互に作用する能力を低下させるもの、ＳＡＰタンパク質が補因子と相互に作用する能力もしくはそのような補因子のレベルを低下させるもの、ＳＡＰのＦｃγＲへの結合を誘因とする経路など、単球中でＳＡＰによって誘発されるシグナル伝達を妨害するものを含むがこれに限らない、様々な機序によって作用する。この経路は、Ｄａｅｒｏｎ、Ｍａｒｃによる「Ｆｃ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第１５巻：２０３～３４ページ（１９９７年）に詳述されている。好例となる実施形態では、副作用を最小限に抑えるために、他のシグナル伝達カスケードに共有されず、または単に数の限られた決定的でないシグナル伝達カスケードに過ぎない経路の一部を選択する。

【００３２】

ＩＬ－４およびＩＬ－１３の影響

本発明のさらに別の態様は、単球にＩＬ－４、ＩＬ－１３、または２種の組合せを供給して、線維細胞の生成を促進する組成物および方法に関する。単球は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにあっても、ｉｎ　ｖｉｖｏにあってもよい。ＩＬ－４およびＩＬ－１３は、外来供給源によって供給してもよいし、または内生を増大させてもよい。より詳細には、ＩＬ－４またはＩＬ－１３は、約０．１～１０ｎｇ／ｍｌの濃度で供給することができる。

【００３３】

線維細胞形成調節の使用例

試料におけるＳＡＰまたはＩＬ－４もしくはＩＬ－１３供給の枯渇もしくは抑制を利用して、単球からの線維細胞へ分化を促進することができる。この作用は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの両方で多くの用途をもつ。例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは、線維細胞形成の促進は、組織工学で有用となり得る。血管新生を必要とする区域で線維細胞を生成すれば、血管新生が誘発される。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは、線維細胞を生成するための、単球の分化の促進を利用して、内部での組織工学に向けることもでき、または新しい脈管構造を必要とする区域で血管生成を誘発することもできる。

【００３４】

さらに、単球の線維細胞への分化をｉｎ　ｖｉｖｏで促進させていくと、創傷治癒を促進し、または整形手術に適用することができる。創傷治癒は、特に、線維細胞が筋線維芽細胞などの他の細胞にさらに分化する能力、線維細胞の血管生成作用、ならびにＡＰＣとして機能し、それによって感染の予防または制御を助けるその能力の恩恵である。

【００３５】

線維細胞がＡＰＣとして機能できる能力のために、慢性に感染した区域、または軟骨など、感染しても免疫系が容易に到達しない区域も、単球の線維細胞への分化が促進されると恩恵を受けることができる。

【００３６】

膵臓腫瘍および腺癌では、示される線維細胞のレベルがより低いので、これらの組織で単球の線維細胞への分化を促進することは、腫瘍の進行の緩慢化を助長し、または寛解の助けとなり得る。

【００３７】

特定の実施例では、本発明は、創傷範囲のＳＡＰを枯渇させ、または抑制して、創傷治癒を促進する方法および組成物を含む。これらの創傷治癒組成物には、ＣＰＨＰＣ、抗ＳＡＰ抗体；高ＥＥＯアガロース上に見られるものなど、Ｂ－Ｄ－ガラクトピラノースの４，６－ピルビン酸アセチル；ホスホエタノールアミンアガロース上に見られるものなどのエタノールアミン、またはＣａ２＋、ならびにこれらの組合せが含まれ得る。ＩＬ－１３、ＩＬ－４、ＦＧＦ、ＴＧＦβなどのサイトカインをこれらの組成物に加えてもよい。

【００３８】

多くの患者では、局所的なＳＡＰの枯渇、またはＳＡＰによって調節される経路の抑制もしくは妨害だけが望ましくなる。本発明の範囲内の多くの組成物は、そのような患者に局所的に投与することができる。例えば、組成物の投与は、軟膏、クリーム、固体、スプレー、蒸気、または創傷包帯剤にするなど、局所的でよい。このような局所製剤は、アルコール、水、消毒薬、他の揮発性物質、または他の薬剤活性のある薬品もしくは薬剤として許容される担体を含んでよい。局所投与は、組成物単独、または別の薬剤活性のある薬品もしくは薬剤として許容される担体との組合せの局所的な注射によるものでもよい。

【００３９】

単球の線維細胞への分化を促進する組成物の局所的な投与を得策とする患者には、軽度～中程度の火傷患者；外科処置の間に負ったものを含む裂傷を被っている患者；潰瘍などの糖尿病の合併症に罹患している患者；内部に圧迫潰瘍もしくは循環の弱い区域のある患者；擦過傷、軽症の挫傷、刺創のある患者；射創または榴散弾による創傷のある患者；開放骨折患者；組織工学上または美容上の理由で組織を成長させる必要のある患者；および免疫抑制の患者、血友病患者、または大部分の創傷がより急速に治癒する恩恵を受けそう

な他の患者が含まれるがこれに限らない。

【００４０】

重症もしくは多数の創傷または他の障害を有する患者では、ＩＶまたは他の全身注射によって組成物をより広く投与して、線維細胞の生成を促進することが適切となり得る。ＳＡＰを枯渇させ、または抑制する薬剤の全身投与が役立ち得る患者には、重症の火傷患者；後期の末梢動脈閉塞性疾患の患者；および一般の創傷治癒障害の患者が含まれるがこれに限らない。

【００４１】

局所投与または全身投与に相応しい製剤もあるかもしれない。さらに、ＳＡＰを粉末などの固体形態で供給し、次いで再形成して、患者に最後に投与する製剤を生成してもよい。

【００４２】

創傷治癒のための好例となる実施形態では、高ＥＯアガロースまたはホスホエタノールアミンアガロースを創傷包帯剤として投与してもよい。この実施形態では、アガロースは、濃度約１％（ｗ／ｖ）でよく、約５ｍＭのＣａＣｌ$_2$を含有していてもよい。創傷包帯剤は、任意の期間にわたり適用することができる。創傷包帯剤は、創傷が閉じるまで継続して適用することができるが（約２日間またはそれ以上）、１２時間などの最初の短期間だけにも適用することができる。このように最初に創傷からＳＡＰを除去することで、十分に単球の線維細胞への分化の促進を引き起こし、創傷治癒を促進することができる。

【００４３】

好例となる別の実施形態では、ＣＰＨＰＣを全身に投与して、広範囲に及ぶ創傷または手に負えない創傷の治癒を促進する。ＣＰＨＰＣは、アミロイド症の実験でマウスでは以前から浸透圧ポンプによって１．５～１５ｍｇ／ｋｇ／日の範囲で投与されている。ＣＰＨＰＣは、飲用水中１ｍｇ／ｍｌの濃度でマウスに投与されている。２０ｇのマウスは、１日約３ｍｌの水を飲み、そのためＣＰＨＰＣ約０．１５ｍｇ／ｋｇ／日を摂取することになる。したがって、このような範囲は、ＳＡＰレベルを低下させるのに人間にはおそらくは安全であるが、異なる範囲が創傷治癒に最適な恩恵をもたらすこともある。

【００４４】

単球分化アッセイ

本発明の別の態様は、単球からの線維細胞への分化を調節する試料の能力を検出するアッセイに関する。無血清培地では、正常な単球は、２～３日で線維細胞になる。正常な血清、血液、または他の生物学的な体液は、特定の希釈度範囲内で正常な単球からの線維細胞の生成を抑制する。すなわち、このアッセイを使用して、試料が、無血清培地中で単球の線維細胞への分化を調節し得るかどうかを試験することができる。このアッセイを使用すると、試料の単球が無血清培地中で正常に線維細胞に分化するかどうか、さらに血清、ＳＡＰ、またはこの分化に影響を及ぼす他の因子に対して正常に応答したかどうかを判定することもできる。

【００４５】

特定の実施形態では、このアッセイを使用して、患者の生物学的な体液の、単球から線維細胞への分化を抑制する能力が低下しているか促進しているかを判定することができる。ＳＡＰによる抑制を試験する場合、本発明では、全血、血清、血漿、滑液、大脳脊髄液、および気管支体液を含めて、ＳＡＰが常時または一過性に存在するどんな生体液を使用してもよい。単球の分化を抑制する能力の促進は、創傷治癒障害または他の障害の指標とすることもでき、またはそのような障害になる性向であるともいえる。多くの患者では、生体液の線維細胞形成抑制能の促進は、ＳＡＰレベルが低いためであるかもしれないが、必ずしもこのとおりでない。ＳＡＰは、正常レベルで存在しても、ＳＡＰ自体の欠陥、または補因子もしくは他の分子の有無のために抑制活性の低下を示すこともある。ＥＬＩＳＡ、電気泳動法、分別など、抑制の問題のより正確な性質を決定する方法は、当分野の技術者に明らかとなろう。

【００４６】

上述の方法を使用して、線維細胞の分化に影響を及ぼすある種の潜在的な薬物が、患者にとって適切となり得るか否かを判定することもできる。

【００４７】

別の特定の実施形態では、このアッセイを使用して、患者の単球が、無血清培地で線維細胞に分化することができるか、ならびに生体液、ＳＡＰ、または別の組成物に正常に応答するかを判定することができる。より詳細には、創傷治癒の問題を抱える患者が正常レベルのＳＡＰをもっていると思われる場合、血清またはＳＡＰなしで分化することができるかを判定するために、患者の単球の試料を得ることが得策となり得る。

【００４８】

最後に、別の特定の実施形態では、このアッセイを使用して、単球の線維細胞への分化に対する薬物または他の組成物の作用を試験することができる。アッセイをこのように使用して、線維細胞の生成を調節するように設計された潜在的な薬物を同定してもよいし、あるいはアッセイを使用して、他の用途に向けた薬物の潜在的な有害事象をスクリーニングしてもよい。

【００４９】

本発明の特定の実施形態を明示するために、以下の実施例を含める。当業者ならば、以下の実施例中で開示する技術は、本発明を実施した際に発明者らが十分に機能することを発見した技術を代表するものであることを承知すべきである。しかし、当業者は、この開示を考えて、本発明の意図および範囲から逸脱することなく、開示する特定の実施形態に多くの変更を加えても、同様または類似の結果が得られることを承知すべきである。

【実施例】

【００５０】

実施例１

線維細胞形成の抑制

末梢血Ｔ細胞の生存における細胞密度の考えられる役割を調べている際に、無血清培地で、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）が線維芽細胞様細胞集団を生じさせたことが観察された。これらの細胞は、粘着性であり、紡錘体型の形態（図１Ａ）であった。無血清培地では約０．５～１％のＰＢＭＣが線維芽細胞様細胞に分化し、この分化は、組織培養によって処理したプラスチック容器、ホウケイ酸塩スライドガラス、および標準のスライドガラスで起こった。

【００５１】

培養して３日以内のこれらの細胞の急速な出現は、ヒトの血清もしくは血漿によって抑制された。この過程をより詳細に調べるため、徐々に増していく各濃度のヒト血漿を含有する無血清培地中で、１ｍｌあたり5×10^{5}細胞のＰＢＭＣを６日間培養した。血漿が１０％～０．５％の濃度で存在するとき、線維芽細胞様細胞には分化しなかった（図１Ｂ）。しかし、０．１％以下の血清では、線維芽細胞様細胞が急速に発育した。線維細胞の生成を抑制した血清の活性は、３０ｋＤａカットオフのスピンフィルターに捕らえられた（データ非表示）。血清を３０分間かけて５６℃に加熱した場合、効力は１０分の１になり、９５℃の加熱は、抑制活性を消滅させた（データ非表示）。

【００５２】

これらのデータは、抑制因子がタンパク質であることを示唆した。阻害因子はヒト血清中に存在していたので、凝固系とは関係がなさそうであることが示唆された。ウシ、ウマ、ヤギ、およびラットの血清も、これらの線維芽細胞様細胞の出現を抑制することができたので、阻害因子は、進化の過程で保存されたタンパク質であるようにも思われた（データ非表示）。

実施例２

【００５３】

線維芽細胞様細胞の特性決定

これら線維芽細胞様細胞が末梢血から分化したことは、これらが末梢血線維細胞であるかもしれないことを示唆した。線維細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで線

維芽細胞様細胞に分化する末梢血単球由来の集団である。線維細胞は、創傷部位にすばやく侵入し、Ｔ細胞に抗原を提示することができる。この細胞の表現型は、ＣＤ４５やＭＨＣクラスＩＩなどの造血性マーカーと、コラーゲンＩやフィブロネクチンなどの間質性マーカーとからなる。しかし、これらの細胞を同定するために、ＰＢＭＣは、一般に、血清を含有する培地で１～２週間培養した。

【００５４】

この系で認められた細胞が線維細胞であるかどうかを特性決定するために、ＰＢＭＣのＴ細胞を抗ＣＤ３で、Ｂ細胞を抗ＣＤ１９で、単球を抗ＣＤ１４で枯渇させ、あるいはすべての抗原提示細胞を抗ＨＬＡクラスＩＩで枯渇させ、次いで血清なしの条件で６日間培養した。ＰＢＭＣを抗ＣＤ３または抗ＣＤ１９で枯渇処理しても、血清なしの培養物中で培養したとき、ＰＢＭＣから線維芽細胞様細胞は枯渇されなかった（データ非表示）。抗原提示細胞を抗ＨＬＡクラスＩＩで、または単球を抗ＣＤ１４抗体で枯渇させると、線維芽細胞様細胞の出現が妨げられたので、線維芽細胞様細胞が単球由来であり、樹状細胞集団でないことが示唆された。

【００５５】

線維芽細胞様細胞をさらに特性決定するために、ＰＢＭＣをスライドガラス上の無血清培地で５日間培養した。次いで、細胞を風乾し、アセトン固定し、種々の抗体で標識した（表１および図２）。線維細胞は、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ４５、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＭＨＣクラスＩＩ、コラーゲンＩ、フィブロネクチン、ケモカイン受容体のＣＣＲ３、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＸＣＲ４、およびα－平滑筋アクチンを発現させる。上記培養条件下では、この実験の線維芽細胞様細胞も、これらすべてのマーカーを発現させた。線維細胞は、ＣＤ１ａ、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ３８、およびｖＷＦについては陰性であり、この実験の線維芽細胞様細胞もそのとおりであった。これらのデータによれば、この実験で認められた線維芽細胞様細胞は、線維細胞であると思われる。さらに実験を行って、この表現型を広げた。上記条件下では、この線維細胞は、α１（ＣＤ４９ａ）、α２（ＣＤ４９ｂ）、α５（ＣＤ４９ｅ）、β１（ＣＤ２９）、およびβ３（ＣＤ６１）に加えて高レベルのβ２（ＣＤ１８）を含む数種のβ１インテグリンを発現させたが、α３、α４、α６、α４β７、αＥ、およびＣＬＡについては陰性であった（図２および表１）。

【００５６】

【表１】

表１：線維細胞上での表面マーカーの発現

マーカー	別名	線維細胞による発現
CD11a	LFA-1	陽性
CD11b	Mac-1	陽性
CD11c		陽性
CD13		陽性
CD18	β２インテグリン	陽性
CD29	β１インテグリン	陽性
CD34		陽性
CD40		弱陽性
CD45	LCA	陽性
CD49a	α1インテグリン	弱陽性
CD49b	α2インテグリン	陰性
CD49e	α5インテグリン	陽性
CD51		陽性
CD54	ICAM-1	陽性
CD58	LFA-3	陽性
CD61	β3インテグリン	陽性
CD80	B7-1	弱陽性
CD86	B7-2	陽性
CD105	エンドグリン	陽性
CD148		陽性
MHCクラスII		陽性
CD162	PSGL-1	陽性
CCR1		弱陽性
CCR3		弱陽性
CCR4		弱陽性
CCR5		弱陽性
CCR7		弱陽性
CCR9		弱陽性
CXCR1		陽性
CXCR3		陽性
CXCR4		弱陽性
コラーゲンI		陽性

コラーゲンIII		陽性
フィブロネクチン		陽性
α平滑筋アクチン		陽性
ビメンチン		陽性
CD1a		陰性
CD3		陰性
CD10		陰性
CD14		陰性
CD19		陰性
CD25		陰性
CD27		陰性
CD28		陰性
CD38		陰性
CD49c	α3インテグリン	陰性
CD49d	α4インテグリン	陰性
CD49f	α6インテグリン	陰性
CD69		陰性
CD70	CD27-L	陰性
CD90		陰性
CD103	αEインテグリン	陰性
CD109		陰性
CD154	CD40-L	陰性
α4β7		陰性
CLA		陰性
CCR2		陰性
CCR6		陰性
CXCR2		陰性
CXCR5		陰性
CXCR6		陰性
サイトケラチン		陰性
vWF		陰性

【００５７】

表１のデータを得るために、８穴スライドガラスのウェルに入った無血清培地中で、１ｍｌあたり（１ウェル４００μｌ）２．５×１０^{5}細胞のＰＢＭＣを６日間培養した。次いで、細胞を風乾し、アセトン固定し、免疫ペルオキシダーゼ染色した。細胞は、アイソタイプを一致させた対照抗体と比較して、示される抗原を陽性または陰性で記録した。

実施例３

【００５８】

線維細胞抑制因子の特性決定

急速な線維細胞への分化を妨げる血清因子の最初の特性決定では、その因子が、イオン交換カラム（Ｈｉｇｈ　Ｑ）から４種のタンパク質のうちの１種として溶出されたヘパリン結合性分子であったことが示された。未変性ゲルから切断したバンドのトリプシン処理タンパク質断片の配列決定を行って、３種のタンパク質のうちの１種をＣ４ｂ結合タンパク質（Ｃ４ＢＰ）として同定した。Ｃ４ｂ結合タンパク質は、７本のα鎖（７０ｋＤａ）

と、通常は１本のβ鎖（４０ｋＤａ）とからなる５７０ｋＤａのタンパク質であり、補体系のＣ４ｂ成分およびＣ２ａ成分の衰退の調節に関与する。Ｃ４ＢＰは、ビタミンＫ依存的な抗凝固タンパク質Ｓとも相互に作用する。Ｃ４ＢＰ／タンパク質Ｓ複合体は、$BaCl_2$沈殿法を使用して、血清または血漿から精製することができる。

【００５９】

Ｃ４ＢＰまたは関連するタンパク質が線維細胞への分化の抑制を司る因子であったかどうかを評価するため、クエン酸血漿を$BaCl_2$処理した。抑制因子は、$BaCl_2$沈殿中に存在した（図３および表２）。この画分をヘパリンカラムにかけ、画分を徐々に増していく各濃度のＮａＣｌで溶離し、無血清培地中で単球の線維細胞への分化を抑制するその能力を評価した。活性因子は、ヘパリンカラムから、２００ｍＭのＮａＣｌ濃度をピークに溶出された（図３および表２）。収量の若干の増加は、このステップが、この因子の活性を若干妨害する因子を除去したかもしれないことを示唆した。

【００６０】

２００ｍＭピークの画分をプールし、Ｈｉｇｈ　Ｑイオン交換クロマトグラフィーによってさらに分別した。３００ｍＭのＮａＣｌで溶出される小さなピークが含んでいた活性は、線維細胞の分化を抑制した。この画分に存在するタンパク質を分析すると、主バンドが２７ｋＤａのタンパク質であったことが示された。イオン交換クロマトグラフィーにかけると、回収されるＳＡＰの量は減少したものの（図３Ａ、レーン８～１０、および図３Ｄ、レーン８～１０）、このステップにより、数種の混入タンパク質が確かに除去された。イオン交換ステップの後、唯一識別できる混入物は６５ｋＤａのアルブミンであった（図３Ａ、レーン１０）。

【００６１】

ＨｉｇｈＱ画分を濃縮し、非還元性ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動によって分別した後、ゲル切片中の物質を溶離した。約１４０ｋＤａのところに移動した単一のバンドが、分化を抑制することができた（図３Ｂ）。このバンドの分子量は、還元性ポリアクリルアミドゲルでは２７ｋＤａであったので、このタンパク質の未変性の構造が五量体であったことが示唆された（図３Ｃ）。このバンドをゲルから切除し、トリプシンで消化し、ＭＡＬＤＩ質量分光測定によって分析した。そこで、大きい方の３種のペプチドと、小さい方の２種のペプチド、すなわち、ＶＦＶＦＰＲ、ＶＧＥＹＳＬＹＩＧＲ、ＡＹＳＬＦＳＹＮＴＱＧＲ、ＱＧＹＦＶＥＡＱＰＫ、およびＩＶＬＧＱＥＱＤＳＹＧＧＫが同定された。これらの配列は、血清アミロイドＰのアミノ酸配列８～１３、６８～７７、４６～５７、１２１～１３０、および１３１～１４３とぴったり一致した。

【００６２】

活性画分がＳＡＰを含んでいたことを確認するため、カラムクロマトグラフィーによって収集した画分をウェスタンブロッティングによって分析した（図３Ｄ）。線維細胞への分化を抑制したすべての画分で、ＳＡＰの存在が２７ｋＤａのところで検出された（図３Ｄ、レーン６、８、１０、および１１）。$BaCl_2$沈殿ステップの上清中にかなりの量のＳＡＰが存在したので、この手順の効率が悪いことが示唆され、$BaCl_2$ペレット中には、線維細胞抑制活性の約１０～１５％しか回収されなかった（図３Ａ、レーン２）。ウェスタンブロッティングと共に使用するときに抗ＳＡＰ抗体が免疫グロブリンに結合するという既知の問題を解消するために、この抗体を、アガロースに結合させたヒトＩｇＧと共に予めインキュベートした。画分のＣＲＰ、Ｃ４ＢＰ、およびタンパク質Ｓの存在についても分析した。ウェスタンブロッティングでは、Ｃ４ＢＰおよびタンパク質Ｓが、血漿中、およびバリウム沈殿物中には存在するが、ヘパリンクロマトグラフィーによって収集した活性画分には存在しないことが示された（データ非表示）。

【００６３】

【表２】

表２：分別されたヒト血漿からのタンパク質および線維細胞抑制活性の回収

	体積 (ml)	タンパク質 (mg/ml)	総タンパク質 (mg)	収率 (%)
血漿	250	70	17,500	100
$BaCl_2$上清	240	60	14,400	82.3
$BaCl_2$沈殿	31	1	31	0.18
ヘパリン画分	4.3	0.25	1.075	0.006
High Q画分	1.96	0.05	0.098	0.00056
ゲル切片	0.075	0.025	0.0018	0.00001
	活性 (U/ml)	総活性 (U)	収率 (%)	比活性 (U/mg)
血漿	10,000	2.5×10^6	100	143
$BaCl_2$上清	6,666	1.6×10^6	64	111
$BaCl_2$沈殿	1,666	5.1×10^4	2	1,645
ヘパリン画分	500	2,150	0.086	2000
High Q画分	400	720	0.029	7,300
ゲル切片	2000	150	0.006	80,000

【００６４】

血漿は、$BaCl_2$沈殿法、ヘパリンクロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーによって分別した。タンパク質濃度は、分光光度法によって２８０ｎｍで評価した。線維細胞の分化の抑制は、形態によって評価した。試料の線維細胞抑制活性は、無血清培地に加えたときに試料が線維細胞への分化を５０％抑制した希釈度の逆数であると定義した。

【００６５】

ＳＡＰは、以下の方法を使用するＥＬＩＳＡによって検出することもできる。

Ｍａｘｉｓｏｒｂ９６穴プレート（Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、ニューヨーク州ロチェスター）を、４０℃のもと、モノクローナル抗ＳＡＰ抗体（ＳＡＰ－５、Ｓｉｇｍａ）の入った５０ｍＭの炭酸ナトリウム緩衝液ｐＨ９．５で被覆した。次いで、プレートを、４％のＢＳＡを含有するトリス緩衝食塩水ｐＨ７．４（ＴＢＳ）（ＴＢＳ－４％ＢＳＡ）中でインキュベートして、非特異的結合を抑制した。血清および精製タンパク質をＴＢＳ－４％ＢＳＡで１０００倍に希釈して、ＳＡＰが凝固しないようにし、３７℃で６０分間インキュベートした。次いで、プレートを０．０５％のＴｗｅｅｎ－２０を含有するＴＢＳで洗浄した。ＴＢＳ－４％ＢＳＡで５０００倍に希釈したポリクローナルウサギ抗ＳＡＰ抗体（ＢｉｏＧｅｎｅｓｉｓ）を検出用抗体として使用した。洗浄した後、ＴＢＳ－４％ＢＳＡで希釈した１００ｐｇ／ｍｌのビオチン標識ヤギ（Ｆａ

ｂ）２抗ウサギ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｃ．）を６０分間かけて加えた。ビオチン標識した抗体をＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎペルオキシダーゼ（Ｓｉｇｍａ）によって検出した。希釈していないペルオキシダーゼ基質３，３，５，５－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ、Ｓｉｇｍａ）を室温で５分間インキュベートした後、１ＮＨＣｌによって反応を停止させ、４５０ｎｍで読み取った（ＢｉｏＴｅｋ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、米バーモント州ウィヌースカ）。アッセイは、２００ｐｇ／ｍｌまで感度があった。

実施例４

【００６６】

血清アミロイドＰの特異性

血清アミロイドＰは、構成血漿タンパク質であり、ヒトの主要な急性相タンパク質であるＣＲＰと近い関係にある。他の血漿タンパク質も線維細胞への分化を抑制することができるかどうかを評価するため、精製した市販のＳＡＰ、ＣＲＰ、Ｃ４ｂ、またはタンパク質Ｓの存在下、ＰＢＭＣを無血清培地で培養した。市販のＳＡＰは、非置換アガロースのカルシウム依存的なアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。試験したタンパク質のうち、ＳＡＰだけが線維細胞への分化を抑制することができ、阻害活性は、１μｇ／ｍｌで最高に達した（図４）。希釈曲線は、市販のＳＡＰの活性が約６．６×10^3単位／ｍｇであることを示唆した（図４）。血清および血漿は、３０～５０μｇ／ｍｌのＳＡＰを含有する。線維細胞は、約０．１５～０．２５μｇ／ｍｌのＳＡＰになるはずの０．５％の血漿希釈度で出現し始めたが、これは、精製ＳＡＰの閾値濃度に匹敵する。異なる２通りの手順を使用して精製したＳＡＰが、線維細胞への分化を抑制することを示すデータは、ＳＡＰが線維細胞への分化を抑制することを強く示唆している。

【００６７】

これらのデータは、ＳＡＰが線維細胞の発育を抑制し得ることを示唆しており、このことを示す方法でＳＡＰが精製されているが、血漿および血清からＳＡＰを枯渇させると抑制が無効になるかどうかを判定したものではない。アガロースビーズ（ＢｉｏＧｅｌ　Ａ、ＢｉｏＲａｄ）を使用して、血漿からＳＡＰを枯渇させた。血漿を１００ｍＭのトリスｐＨ８、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの$CaCl_2$緩衝液で２０％に希釈し、４０℃で２時間、１ｍｌのアガロースビーズと混合した。次いで、遠心分離によってビーズを除去し、この過程を繰り返した。次いで、この枯渇処理した血漿の、線維細胞への分化を抑制する能力を評価した。１００ｍＭのトリスｐＨ８、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの$CaCl_2$緩衝液で２０％に希釈した対照血漿の希釈曲線は、未処理の血漿で認められるものと類似していた。対照的に、ビーズで処理した血漿は、中程度の血漿レベルでは線維細胞への分化をそれほど抑制することができなかった。これらのデータ、ならびに精製ＳＡＰが線維細胞への分化を抑制できることは、ＳＡＰが、線維細胞への分化を抑制する血清および血漿中の活性因子であることを強く示唆している（図５Ａを参照のこと）。

【００６８】

血漿のＳＡＰの、抗ＳＡＰ抗体で被覆したタンパク質Ｇビーズを使用する枯渇処理も行った。ＳＡＰを除去すると、血漿の、線維細胞への分化を抑制する能力が、血漿、または対照抗体で被覆したビーズで処理した血漿と比べて有意に低下した（ｐ＜０．０５）（図５Ｂ）。対照抗体で被覆したビーズは、血漿からいくらかの線維細胞抑制活性を除去したが、これは、血漿と共に培養した細胞と有意に異なってはいなかった。このことはおそらく、ＳＡＰがタンパク質Ｇビーズ中のアガロースに結合していることを反映している。これらのデータ、ならびに精製ＳＡＰが線維細胞への分化を抑制できることは、ＳＡＰが、線維細胞への分化を抑制する血清および血漿中の活性因子であることを強く示唆している。

実施例５

【００６９】

抗体およびタンパク質

精製されたヒトＣＲＰ、血清アミロイドＰ、タンパク質Ｓ、およびＣ４ｂは、Ｃａｌｂ

ｉｏｃｈｅｍ（米カリフォルニア州サンディエゴ）から購入した。ＣＤ１ａ、ＣＤ３、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ３４、ＣＤ４０、Ｐａｎ ＣＤ４５、ＣＤ６４、ＣＤ８３、ＣＤ９０、ＨＬＡ－ＤＲ／ＤＰ／ＤＱ、マウスＩｇＭ、マウスＩｇＧ１、およびマウスＩｇＧ２ａに対するモノクローナル抗体は、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、米カリフォルニア州サンディエゴ）から得た。ケモカイン受容体抗体は、Ｒ ａｎｄ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（米ミネソタ州ミネアポリス）から購入した。ウサギ抗コラーゲンＩはＣｈｅｍｉｃｏｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（米カリフォルニア州テメキュラ）から、モノクローナルＣ４ｂ結合タンパク質はＧｒｅｅｎ Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（米バーモント州バーリントン）から、ヒツジ抗ヒトＣ４ｂ結合タンパク質はＴｈｅ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｉｔｅ（英バーミンガム）から、モノクローナル抗ＣＲＰはＳｉｇｍａ（米ミズーリ州セントルイス）から得た。ポリクローナルウサギ抗タンパク質Ｓは、Ｂｉｏｇｅｎｅｓｉｓ（英国ドーセット州プール市）から得た。

実施例６

【００７０】

細胞の分離

Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、米ニュージャージー州ピスカタウェイ）による４００×ｇでの遠心分離に４０分間かけて、バフィーコート（Ｇｕｌｆ Ｃｏａｓｔ Ｒｅｇｉｏｎａｌ Ｂｌｏｏｄ Ｃｅｎｔｅｒ、米テキサス州ヒューストン）から末梢血単各細胞を単離した。ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｄｙｎａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．、米ニューヨーク州レークサクセス）を使用するネガティブ選択を利用して、以前に記載したとおりに、指定された白血球サブセットの枯渇処理を行った。簡潔に述べると、ＰＢＭＣを一次抗体と共に４０℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、ヤギ抗マウスＩｇＧで被覆したＤｙｎａｂｅａｄｓと共に３０分間インキュベートした後、磁気選択によって抗体で覆われた細胞を除去した。この過程を２回繰り返した。ネガティブ選択した細胞の純度は、モノクローナル抗体標識によって判定したところ、決まって９８％を超えていた。

実施例７

【００７１】

細胞培養および線維細胞分化アッセイ

細胞を、次のような無血清培地、すなわち、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ／Ｌｉｆｅ）、２ｍＭのグルタミン、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、０．２％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ）、５μｇ／ｍｌのインスリン（Ｓｉｇｍａ）、５μｇ／ｍｌの鉄で飽和させたトランスフェリン（Ｓｉｇｍａ）、および５ｎｇ／ｍｌの亜セレン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ）を補充したＲＰＭＩ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｌｉｆｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、米カリフォルニア州カールスバッド）中でインキュベートした。正常ヒト血清（Ｓｉｇｍａ）、正常ヒト血漿（Ｇｕｌｆ Ｃｏａｓｔ Ｒｅｇｉｏｎａｌ Ｂｌｏｏｄ Ｃｅｎｔｅｒ）、またはウシ胎児血清（Ｓｉｇｍａ）、カラム画分、患者の血清および滑液、または精製タンパク質を所定の濃度で加えた。患者試料は、ヒューストンのテキサス大学医学部にある、研究者に開放されている貯蔵所から入手した。この貯蔵所は、患者の情報を守秘し、ＮＩＨ指針をすべて満たしている。

【００７２】

５％のCO_2を含む加湿インキュベーター中で、体積がそれぞれ２ｍｌまたは２００μｌの２４穴または９６穴の組織培養プレート（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、米ニュージャージー州フランクリンレークス）に入った１ｍｌあたり２．５×10^5細胞のＰＢＭＣを、３７℃で指示どおりの時間培養した。小さなリンパ球または付着単球と異なる、引き伸ばされた紡錘型の形態を有する付着細胞として生存培養物中に存在する形態によって、異なる５箇所の直径９００μｍ視野にある線維細胞を数えた。あるいは、細胞を風乾し、メタノール固定し、ヘマトキシリンエオシン染色を施した（Ｈｅｍａ３ Ｓｔａｉ

ｎ、ＶＷＲ、米テキサス州ヒューストン）。上記の判断基準、および楕円形の核の存在を利用して線維細胞を数えた。線維細胞のカウントは、ウェルあたり２．５×１０^{4}細胞の細胞を平底９６穴プレートで６日間培養したものについて行った。さらに、免疫ペルオキシダーゼ染色によって線維細胞の同一性を確認した（以下を参照のこと）。試料の線維細胞抑制活性は、無血清培地に加えたときに試料が線維細胞への分化を５０％抑制した希釈度の逆数であると定義した。

実施例８

【００７３】

血清タンパク質および血漿タンパク質の精製と特性決定

冷凍ヒト血清もしくは血漿１００ｍｌを３７℃ですばやく解凍し、１倍「Ｃｏｍｐｌｅｔｅ」プロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ、米インディアナ州インディアナポリス）、１ｍＭのベンズアミジンＨＣｌ（Ｓｉｇｍａ）、および１ｍＭのＰｅｆａｂｌｏｃ（ＡＥＢＳＦ：フッ化４－（２－アミノエチル）－ベンゼンスルホニル塩酸塩、Ｒｏｃｈｅ）を加えた。後続のステップはすべて、氷上または４℃で実施した。血漿を、以前に述べたとおりに、クエン酸バリウムに吸着させた。１０，０００×ｇで１５分間の遠心分離にかけて、沈殿を収集し、１００ｍＭのＢａＣｌ$_{2}$プラス阻害剤２０ｍｌに再懸濁し、遠心分離にかけ直した。２回洗浄した後、ペレットを、５ｍＭのＥＤＴＡおよび１ｍＭのベンズアミジンＨＣｌを含有する１０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ７．４に再懸濁して２０ｍｌとし、同じ緩衝液４リットルを３回交換しながら２４時間かけて透析した。

【００７４】

Ｅｃｏｎｏ ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、米カリフォルニア州ハーキュレス）を使用するクロマトグラフィーを行って、流速１ｍｌ／分で１ｍｌの試料を収集した。透析処理したクエン酸バリウム沈殿を５ｍｌ容Ｈｉ－Ｔｒａｐ Ｈｅｐａｒｉｎカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に装入し、２８０ｎｍでの吸光度が基点に戻るまで、カラムを１０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ７．４で十分に洗浄した。結合している材料を、１００、２００、３００、および５００ｍＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ７．４各１５ｍｌで段階的に勾配をかけて溶離した。単球の線維細胞への分化を阻害した画分は、２００ｍＭのＮａＣｌで溶出された。これらをプールし（２ｍｌ）、５ｍｌ容Ｅｃｏｎｏ－Ｐａｋ Ｈｉｇｈ Ｑカラムに装入した。１０ｍＭのリン酸緩衝液でカラムを洗浄した後、結合している材料を上記のように段階的な勾配をかけて溶離したが、活性画分は、３００ｍＭのＮａＣｌで溶出された。

【００７５】

Ａｑｕａｃｉｄｅ ＩＩ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を使用して、Ｈｉｇｈ Ｑクロマトグラフィーの活性画分を２００μｌに濃縮し、次いで以前に述べたとおりに４～２０％の未還元性ポリアクリルアミドゲル（ＢＭＡ、ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ、米メイン州ロックランド）上に載せた。電気泳動にかけた後、ゲルのレーンを切断して５ｍｍの切片とし、１ｍＭのベンズアミジンＨＣｌを含有する２００μｌの２０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、５ｍＭ ＥＤＴＡ ｐＨ７．４と混合し、エッペンドルフ試験管に入れて小さな乳棒で砕き、４℃で３日間転倒型ミキサーに入れておいた。ゲルから溶出されたタンパク質の活性を分析した。アミノ酸配列を得るため、ゲル切片から溶出されたタンパク質を、１００μＭのチオグリコール酸を含む上部チャンバー（Ｓｉｇｍａ）中の４～２０％のゲル上に載せた。電気泳動にかけた後、ゲルを直ちにクーマシーブリリアントブルーで染色し、脱染色し、ゲルからバンドを切除した。アミノ酸の配列決定は、Ｂａｙｌｏｒ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、免疫学科、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ＦａｃｉｌｉｔｙのＲｉｃｈａｒｄ Ｃｏｏｋ博士が行った。

実施例９

【００７６】

ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングについては、血漿および血清試料を１０ｍＭのリン酸ナトリウムｐＨ７．４で５００倍に希釈した。ヘパリンカラムおよびＨｉｇｈ Ｑカラムからの

画分は希釈しなかった。試料を、２０mMのＤＴＴを含有するＬａｅｍｍｅｌｉ試料緩衝液と混合し、５分間かけて１００℃に加熱した。試料を４～２０％のトリス／グリシンポリアクリルアミドゲル（Ｃａｍｂｒｅｘ）上に載せた。未変性ゲル用の試料は、ＤＴＴまたはＳＤＳなしで分析した。タンパク質を、２０％のメタノールを含有するトリス／グリシン／ＳＤＳ緩衝液中のＰＶＤＦ（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ Ｐ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、米マサチューセッツ州ベッドフォード）膜に移した。フィルターを、４℃で１８時間かけて、５％のＢＳＡ、５％の無脂肪乳タンパク質、および０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するトリス緩衝食塩水（ＴＥＳ）ｐＨ７．４でブロックした。所定の最適希尺度（データ非表示）を使用して、一次抗体およびビオチン標識二次抗体を、５％のＢＳＡ、５％の無脂肪乳タンパク質、および０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ ｐＨ７．４で６０分間かけて希釈した。５％のＢＳＡおよび０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ ｐＨ７．４で希釈したＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎペルオキシダーゼ（Ｓｉｇｍａ）を使用してビオチン標識抗体を同定し、化学発光法（ＥＣＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して結果を可視化した。

実施例１０

【００７７】

免疫組織化学

ガラス製８穴顕微鏡スライド（Ｌａｂ－Ｔｅｋ、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、米イリノイ州ネーパーヴィル）上で培養した細胞を風乾した後、１５分間アセトン固定した。内発性のペルオキシダーゼを０．０３％のH_2O_2で１５分間かけて失活させ、次いで、２％のＰＢＳ中ＢＳＡの中で６０分間インキュベートして非特異的結合をブロックした。スライドを、２％のＢＳＡを含有するＰＢＳ中の一次抗体を加えて６０分間インキュベートした。アイソタイプを一致させた、関連性のない抗体を対照として使用した。次いで、スライドを１５分間かけてＰＢＳで３回洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗マウスＩｇ（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）と共に６０分間インキュベートした。洗浄した後、ＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎペルオキシダーゼ（Ｓｉｇｍａ）によってビオチン標識抗体を検出した。染色の発色は、ＤＡＢ（ジアミノベンジジン、Ｓｉｇｍａ）で３分間かけて行い、マイヤーのヘマラム（Ｓｉｇｍａ）で３０秒間の対比染色を行った。

実施例１１

【００７８】

線維細胞上の表面マーカーの発現

８穴スライドガラスのウェルに入った無血清培地中で、１ｍｌあたり（１ウェル４００μｌ）２．５×10^5細胞のＰＢＭＣを６日間培養した。次いで、細胞を風乾し、アセトン固定し、免疫ペルオキシダーゼ染色を施した。細胞は、アイソタイプを一致させた対照抗体と比較して、示される抗原を陽性または陰性で記録した。

実施例１２

【００７９】

分別にかけたヒト血漿からのタンパク質および線維細胞抑制活性の回収

血漿は、$BaCl_2$沈殿法、ヘパリンクロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーによって分別した。タンパク質濃度は、吸光分光分析によって２８０ｎｍで評価した。線維細胞への分化の抑制は、形態によって評価した。試料の線維細胞抑制活性は、無血清培地に加えたときに試料が線維細胞への分化を５０％抑制した希釈度の逆数であると定義した。

実施例１３

【００８０】

高ＥＥＯアガロース帯具を用いるラットの創傷治癒試験

本発明の一適用例は、小さな切傷や手術による切開などの小さな創傷、ならびに糖尿病性潰瘍などの慢性の潰瘍の治療に関する。これらおよび類似の適用例のために開発された治療は、より大きな創傷およびより重症の問題の治療に向けて容易に変更することもできる。

【００８１】
創傷治癒ではＳＡＰの局所的な枯渇が重要であり、上述のものなどの実験によって、ＳＡＰが、当業界で高ＥＥＯアガロースとして知られている、ある種類のアガロースに特によく結合することが明らかになった。この結合が、カルシウムの存在によって影響を受けることも確定した。
【００８２】
カルシウム／アガロース帯具が創傷治癒に及ぼす影響を試験するため、麻酔をかけた３匹のラットの背中に、皮膚の層を完全に貫通する４ｃｍの創傷を設けた（図６を参照のこと）。創傷からの出血はほとんどなかった。１匹のラットは、１ｍｌの生理食塩水（０．９％ｗ／ｖの水中ＮａＣｌ）で軽くぬらした４×４ガーゼ帯具（Ｔｏｐｐｅｒ４ｘ４スポンジガーゼ、Ｊｏｈｎｓｏｎ　＆　Ｊｏｈｎｓｏｎ、米ニュージャージー州スキルマン）のみで処置した。このガーゼの層を乾いた４×４ガーゼ帯具で覆い、いく層かのＶｅｔｗｒａｐ（登録商標）（３Ｍ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、米ミネソタ州セントポール）をラットの胴体に巻きつけて、これらのガーゼを定位置に保持した。２番目のラットは、最初の層を生理食塩水／５ｍＭの$CaCl_2$（１ｍｌ）で軽くぬらした、同様の帯具で処置した。
【００８３】
３番目のラットは、アガロース／$CaCl_2$帯具で処置した。この帯具の最初の層を準備するため、０．２ｇの高ＥＥＯアガロース（電気泳動グレードの高ＥＥＯアガロース　製品番号ＢＰ－１６２、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、米ニュージャージー州フェアローン）は、５０ｍｌ容ポリプロピレン試験管（Ｆａｌｃｏｎ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、米ニュージャージー州フランクリンレークス）中の溶液を、混合物が沸騰し始めるまで電子レンジで加熱することによって、上述の生理食塩水／$CaCl_2$溶液２０ｍｌに溶解させた。かき回してアガロースを溶解させた後、１ｍｌの熱い混合物を４×４ガーゼ帯具上に注ぎ、１枚のサランラップ（登録商標）の上に平らに置いておいた。アガロース－$CaCl_2$－生理食塩水を含浸させたガーゼ帯具を冷ました。次いで、これを３番目のラットの帯具の最初の層として使用した。２枚目の層の乾いたガーゼおよびＶｅｔｗｒａｐ（登録商標）のカバーを、初めの２匹のラットで行ったように適用した。
【００８４】
麻酔、創傷処置、および帯具装着の間の時間の差を最小限に抑えるために、各ラットの麻酔、写真撮影、および帯具装着は別々に行った。
【００８５】
２４時間後、ラットを軽く麻酔し、秤量し、次いで帯具を外し、創傷の写真撮影を行った（図７を参照のこと）。次いで、最初と同じ組成の新しい帯具を各ラットに適用し直した。さらに２４時間後、この過程を繰り返して、さらに写真を撮った（図８を参照のこと）。
【００８６】
アガロース／$CaCl_2$帯具で処置したラットは、他の２匹のラットのどちらよりもかなり急速な創傷治癒を示した（図８Ｂを参照のこと）。
【００８７】
この実施例ではアガロース帯具を１日ごとに適用し直したが、本発明の他の実施形態では、アガロース帯具を最初、または最初と１日目くらいだけ適用し、その後、創傷がほぼ閉じたなら乾いた帯具を適用してもよい。創傷が閉じたら、アガロースのＳＡＰ吸収能力は、限られるといえる。閉じた創傷が、乾燥させる環境の恩恵を得ることもできる。
【００８８】
この実施例では水和したアガロースを使用したが、それほど水和していないアガロースを含む帯具および他の製剤を利用することも可能である。アガロースは、創傷自体から漏れ出る血清によって湿り気を得ることができる。
【００８９】
本発明の局所用アガロース調製物は、創傷の浄化および創傷治癒の促進を可能にするた

め、防腐剤を使用して調製してもよい。特定の実施例では、最初に創傷を浄化し、次いで時間と共に蒸発することのできるアルコールを加えたアガロースを調製してもよい。

実施例１４

【００９０】

局所の創傷治癒実施形態で使用する追加因子

上記のアガロース帯具は、創傷治癒の促進に実に有効であることがわかったが、認められた作用は、帯具または他の局所用アガロース製剤に他の創傷治癒因子を加えることによって多分に促進できそうである。そのような因子には、小分子やポリペプチドなどの任意の化合物または組成物が含まれ得る。

【００９１】

特に、これらの因子は、別途の創傷治癒経路に影響を及ぼしてもよく、または線維細胞形成経路に影響を及ぼしてもよい。またこれら因子は、ＳＡＰとは異なる方法で線維細胞形成経路に影響を及ぼしてもよく、またはＳＡＰと類似の機序によってそれに影響を及ぼす、例えば、アガロース製剤中の抗体がさらにＳＡＰを結合し、失活させてもよい。

【００９２】

その一部が創傷治癒にも作用する、他の諸問題に対処する因子を含めることもできる。例えば、血友病患者向けのアガロース帯具は、創傷からの出血を止め、または防ぐために凝固因子をさらに含んでよい。

【００９３】

特定の実施形態では、ＩＬ－４および／またはＩＬ－１３をアガロース製剤に含めることができる。両者とも線維性応答の強力な賦活物質である。ＩＬ－４は、創傷の修復および治癒において役割を担うことが以前から述べられている。

【００９４】

実験は、ＩＬ－４およびＩＬ－１３がｉｎ　ｖｉｔｒｏで線維細胞への分化を促進し得ることを示した。詳細には、ＩＬ－４またはＩＬ－１３の存在下、末梢血単核細胞を無血清培地で培養した。１０～０．１ｎｇ／ｍｌのＩＬ－４もしくはＩＬ－１３濃度が、培養中の線維細胞数を増大させた（図９を参照のこと）。このことは、ＩＬ－４およびＩＬ－１３が、線維細胞前駆体の成熟線維細胞への分化を促進し得ることを示唆している。したがって、ＩＬ－４および／またはＩＬ－１３をさらに含有する上述のような帯具または他の局所用アガロース製剤は、創傷治癒の更なる促進を示すことが予想される。

【００９５】

上述のようなアガロース帯具もしくは局所用製剤に加えることのできる他の因子、または模倣される生理的条件には、

ＳＡＰに結合することがわかっている分子、すなわち、

コラーゲンＩＶ、

ラミニン、

フィブロネクチン、

Ｃ４ＢＰ、

凝集したＩｇＧのＦｃ、

ＣＤ１６、ＣＤ３２、およびＣＤ６４：Ｆｃ受容体、

ヘパリン、

ＬＰＳ、

アポトーシス細胞、特にクロマチンおよびＤＮＡ、

ザイモザン

が含まれる。

【００９６】

ＳＡＰ結合に関係のある生理的条件は、

ＳＡＰが、例えば血清アミロイドＡ（ＳＡＡ）、免疫グロブリン軽鎖、β２ミクログロブリン、トランスチレチン、および神経原線維濃縮体から生成したアミロイド線維へのカルシウム依存的な結合を示すこと、

ＳＡＰが、ガラクトースのピルビン酸アセチルが発現されるため、また細菌表面上の他の糖のために細菌表面に結合すること
である。
【００９７】
ＳＡＰは、「人工」リガンドの高ＥＥＯアガロースおよびホスホエタノールアミン－アガロースに、また低い親和性でホスホコリン－セファロースに結合する。これらの特徴をもとに、血清または血漿からＳＡＰを精製する２通りの手段が生まれる。第１に、ＳＡＰは、高ＥＥＯアガロースに、アガロース調製物の副次的な成分である－ガラクトースのピルビン酸アセチルを介して結合させることができる。第２に、ＳＡＰをホスホエタノールアミン－アガロースに結合させることができ、これは、現在当業界で好まれているＳＡＰ精製法である。したがって、帯具または局所用製剤にホスホエタノールアミン－アガロースを使用することができる。
【００９８】
本発明の単に例示的な実施形態を上で詳述しているが、本発明の真意および意図する範囲から逸脱することなく、これら実施例の変更形態および変形形態が考えられることは承知されよう。
【図面の簡単な説明】
【００９９】
【図１】線維芽細胞様細胞への急速な分化に対する血清および血漿の影響を示す図である。　図１Ａでは、無血清培地で、１ｍｌあたり２．５×１０^{5}の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、０．１％のヒト血清の存在下または不在下で３または６日間培養し、次いで、線維芽細胞様細胞が出現したかどうか顕微鏡で調べた。帯は１００μｍである。　図１Ｂでは、無血清培地で、１ｍｌあたり２．５×１０^{5}のＰＢＭＣを、ヒト血漿の希釈物中で６日間培養した。次いで、細胞を風乾し、固定し、染色し、形態によって線維細胞を数えた。結果は、２．５×１０^{5}ＰＢＭＣあたりの線維細胞数の平均±ＳＤとして示す（ｎ＝５実験）。星印は、０ＳＡＰ値からの統計学的有意差がある値を示す。
【図２】線維芽細胞様細胞上の表面分子の発現を示すグラフである。ＰＢＭＣを、スライドガラス上の無血清培地で６日間培養した。細胞を風乾し、免疫組織化学によって分析した。使用したモノクローナル抗体は、表示したとおりであり、ビオチン結合ヤギ抗マウスＩｇ、次いでＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎペルオキシダーゼによって同定した。細胞にマイヤーヘマトキシリンで対比染色を施して、核を確認した。陽性の染色は、褐色の染色によって確認したが、核は、青色に対比染色される。ＣＤ８３への書き込みは、樹状細胞への陽性染色を示すために用いた。
【図３】血漿中に存在する、線維細胞への分化を抑制する分子の特性決定を示す図である。クエン酸血漿をＢａＣｌ２で処理し、沈殿した物質を遠心分離によって収集し、１０ｍＭのＥＤＴＡおよびプロテアーゼ阻害剤を含有する１０ｍＭのリン酸ナトリウムを用いて透析した。次いで、この物質をヘパリンクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによって分別した。　図３Ａでは、画分を４～２０％の変性ゲル上でのＰＡＧＥによって分析し、クーマシーブルーで染色した。Ｍは、分子量マーカーを示す。レーン１は血漿を含み、レーン２は$BaCl_2$上清を含み、レーン３は洗液１を含み、レーン４は洗液２を含み、レーン５は$BaCl_2$沈殿を含み、レーン６は$BaCl_2$沈殿を含み、レーン７はヘパリン通過物を含み、レーン８はヘパリン画分を含み、レーン９はＨｉｇｈ　Ｑ通過物を含み、レーン１０はＨｉｇｈ　Ｑ画分を含み、レーン１１はゲル精製された画分を含んでいた。レーン１～５は、リン酸ナトリウム緩衝液で５００倍に希釈し、レーン６～１１は希釈しなかった。　Ｈｉｇｈ　Ｑイオン交換カラムから溶出された活性画分およびゲル切片を、図３Ｂでは未変性ゲル上、図３Ｃでは変性ゲル上での４～２０％ＰＡＧＥによって分析した。ＮＭは未変性ゲルマーカーを示し、ＲＭは変性ゲルマーカーを示し、図３Ｂではレーン１～３が対照ゲル試料であり、レーン４が活性画分を含んでいた。図３Ｄでは、ウサギ抗ＳＡＰ抗体を使用して、画分をウェスタンブロッティングによって評価した。レーン１～１１は、図３Ａと対応している。

【図４】線維細胞の生成がＳＡＰによって抑制され、ＣＲＰまたは他の血漿タンパク質によっては抑制されないことを示すグラフである。無血清培地で、１ｍｌあたり２．５×１０^{5}のＰＢＭＣを、精製した市販のＳＡＰ（黒四角）、ＣＲＰ（白四角）、タンパク質Ｓ（白ひし形）、またはＣ４ｂ（白丸）の存在下で６日間培養し、次いで、線維芽細胞様細胞が出現したかどうかを調べた。次いで、細胞を風乾し、固定し、染色し、形態によって線維細胞を数えた。結果は、２．５×１０^{5}のＰＢＭＣあたりの線維細胞の平均±ＳＤである（ｎ＝３通りの独立した実験）。

【図５】線維細胞分化アッセイにおける血漿からのＳＡＰの除去の影響を示すグラフである。　図５Ａは、ＢｉｏＧｅｌアガロースビーズを用いての血漿からのＳＡＰの除去が線維細胞への分化に及ぼす影響を示す。様々な希釈度の血漿（白四角）またはＢｉｏＧｅｌによって枯渇処理した血漿（黒四角）を供給したアッセイで見られた線維細胞の数を示す。　図５Ｂは、血漿なし、または等希釈度の血漿、ＢｉｏＧｅｌ　ＳＡＰ枯渇処理血漿、もしくは抗ＳＡＰ抗体枯渇処理血漿を用いて実施したアッセイで生成した線維細胞の数を示す。星印は、統計学的有意差を示す。

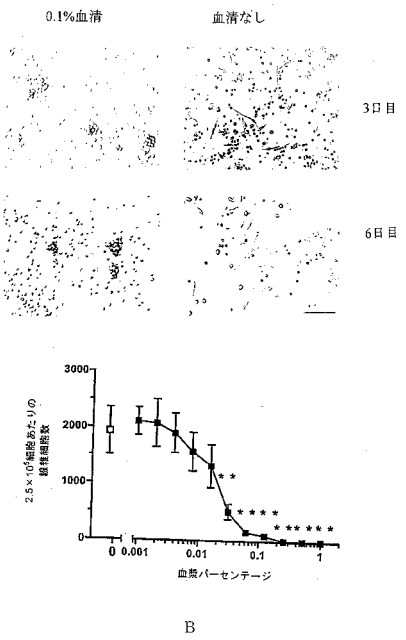
【図６】生理食塩水、ＣａＣｌ$_{2}$添加生理食塩水、または生理食塩水およびＣａＣｌ$_{2}$添加アガロースで処置することになる、異なる３匹のラットの最初の皮膚切開部を示す写真である。

【図７】図６で示した皮膚切開部の治癒を示す写真である。図７Ａは、生理食塩水、ＣａＣｌ$_{2}$添加生理食塩水、または生理食塩水およびＣａＣｌ$_{2}$添加アガロースで処置してから１日後の、異なる３匹のラットの皮膚切開部の治癒を示す。図７Ｂは、異なる３匹のラットの最初の皮膚切開部と、生理食塩水、ＣａＣｌ$_{2}$添加生理食塩水、または生理食塩水およびＣａＣｌ$_{2}$添加アガロースで処置してから１日後の治癒との比較を示す。

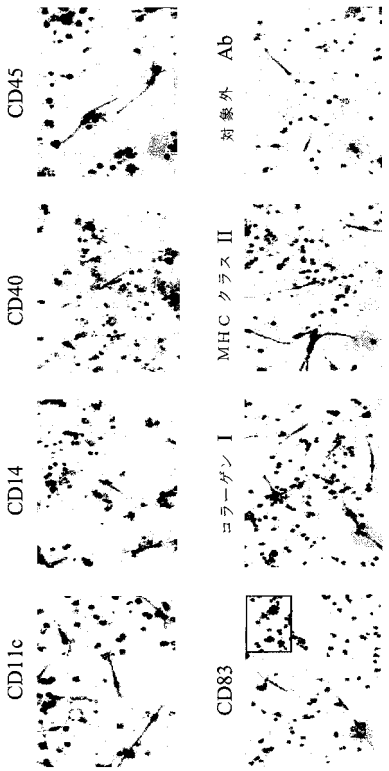
【図８】ラットの皮膚切開部の治癒を示す写真である。図８Ａは、生理食塩水、ＣａＣｌ$_{2}$添加生理食塩水、または生理食塩水およびＣａＣｌ$_{2}$添加アガロースで処置してから２日後の、異なる３匹のラットの皮膚切開部の治癒を示す。図８Ｂは、異なる３匹のラットの最初の皮膚切開部と、生理食塩水、ＣａＣｌ$_{2}$添加生理食塩水、または生理食塩水およびＣａＣｌ$_{2}$添加アガロースで処置してから１日後および２日後の治癒との比較を示す。

【図９】様々なサイトカインが線維細胞への分化の促進に及ぼす作用を示すグラフである。

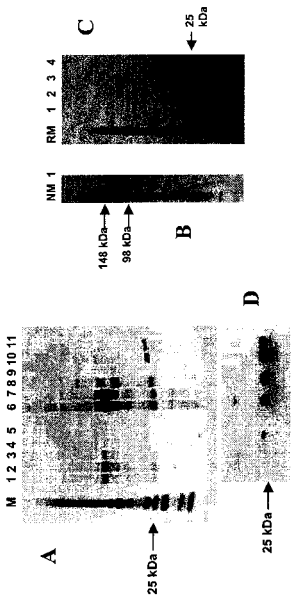
【図１】


0.1%血清
血清なし
3日目
6日目
3000
2000
1000
0
0 0.001 0.01 0.1 1
血漿パーセンテージ
B

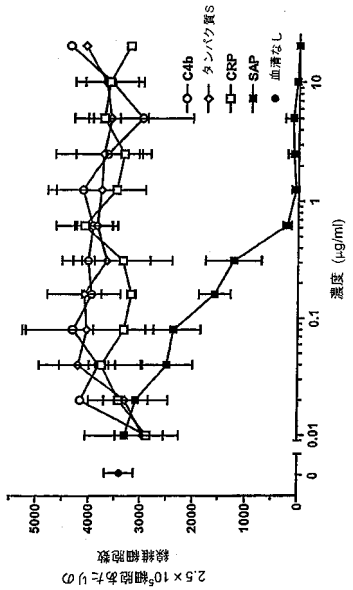
【図２】


CD45
CD40
CD14
CD11c
対象外 Ab
MHC クラス II
コラーゲン I
CD83

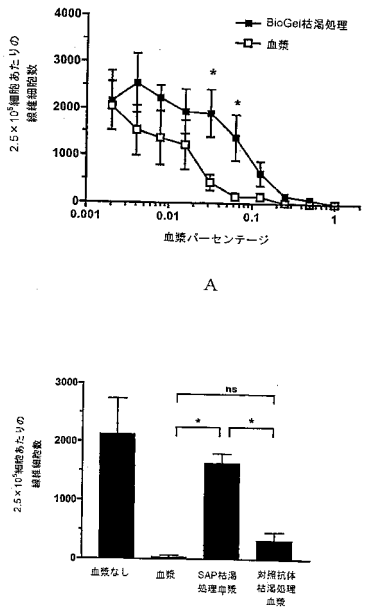
【図３】


C
25 kDa
RM 1 2 3 4
NM 1
148 kDa
98 kDa
B
D
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
A
25 kDa
25 kDa

【図４】


C4b
タンパク質S
CRP
SAP
血清なし
濃度 (μg/ml)
0 0.01 0.1 1 10
0 1000 2000 3000 4000 5000

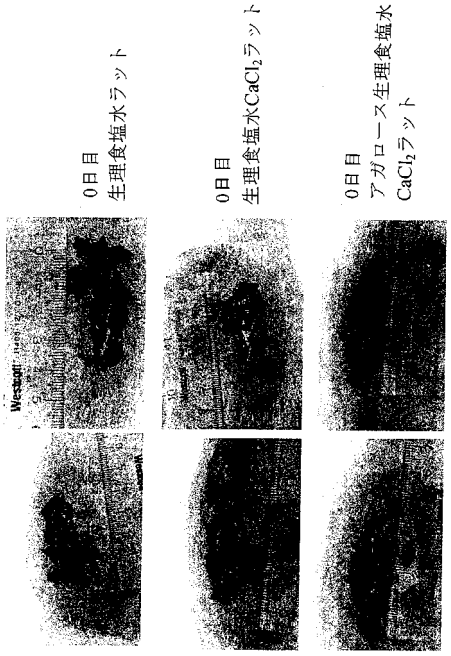
【図５】



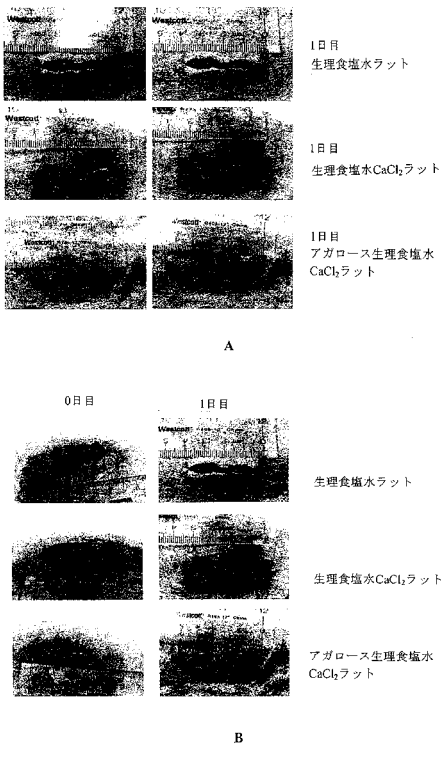
A

B

【図６】



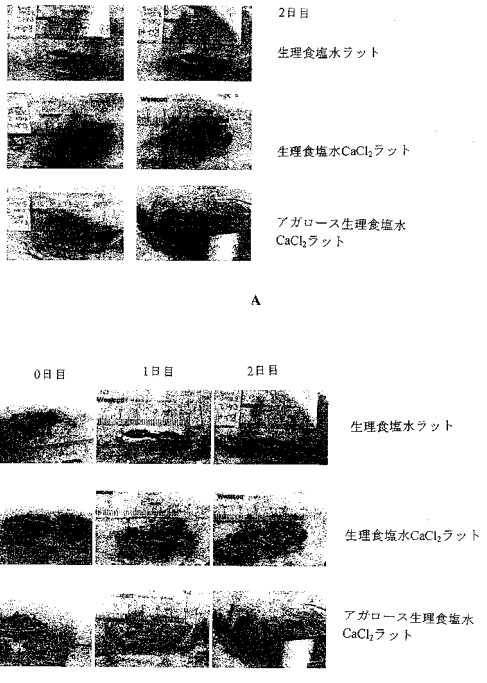
【図７】



A

B

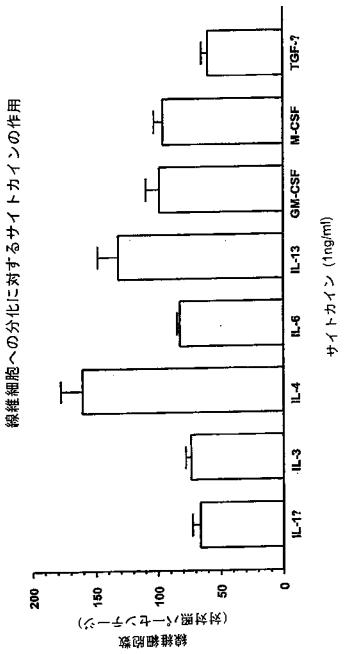
【図８】



A

B

【図９】



【配列表】
0004819364000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ａ６１Ｋ	***38/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/02	
Ａ６１Ｋ	***31/7012***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/7012	
Ａ６１Ｐ	***17/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	17/02	
Ａ６１Ｐ	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５

(31)優先権主張番号 60/515,776
(32)優先日 平成15年10月30日(2003.10.30)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/519,467
(32)優先日 平成15年11月12日(2003.11.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/525,175
(32)優先日 平成15年11月26日(2003.11.26)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第９９／０４５９００（WO，Ａ１）
特開昭５４－００５０２３（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－３１９５４２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 31/729
A61K 9/70
A61K 31/7012
A61K 38/00
A61K 47/02
A61L 15/16
A61L 26/00
A61P 17/02
A61P 43/00
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)