

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6581208号
(P6581208)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 35/747 (2015.01)

A 6 1 K 35/747

A 6 1 K 38/19 (2006.01)

A 6 1 K 38/19

A 6 1 L 15/36 (2006.01)

A 6 1 L 15/36 1 0 0

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 17/02

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

請求項の数 18 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-552233 (P2017-552233)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月23日(2015.12.23)
 (65) 公表番号 特表2018-502600 (P2018-502600A)
 (43) 公表日 平成30年2月1日(2018.2.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/081146
 (87) 国際公開番号 W02016/102660
 (87) 国際公開日 平成28年6月30日(2016.6.30)
 審査請求日 平成30年2月5日(2018.2.5)
 (31) 優先権主張番号 1451658-7
 (32) 優先日 平成26年12月23日(2014.12.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 スウェーデン(SE)

(73) 特許権者 517223990
 イリヤ ファーマ エービー
 スウェーデン、7 5 3 2 6 ウプサラ、
 エスティー イェーランスガタン 2 3、
 エヴェリナ ヴォーゲスイエー
 (74) 代理人 110000040
 特許業務法人池内アンドパートナーズ
 (72) 発明者 ヴォーゲスイエー、エヴェリナ
 スウェーデン、7 5 3 2 6 ウプサラ、
 エスティー イェーランスガタン 2 3
 審査官 西村 亜希子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷治癒の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトまたは動物の対象体における皮膚創傷を治癒するために皮膚創傷に直接投与するの
 に用いる局所用医薬組成物であって、

前記局所用医薬組成物は、乳酸菌および少なくとも1つの薬学的に許容される担体また
 は賦形剤を含み、

前記乳酸菌は、ラクトバチルス・ロイテリ株であり、かつ、前記乳酸菌においてC X C
 L 1 2、C X C L 1 7、およびY m 1 からなる群から選択されるタンパク質を発現可能な
 プラスミドで形質転換されている、局所用医薬組成物。

【請求項 2】

前記プラスミドは、

(i) 配列番号 3 もしくは 2 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一
 性が少なくとも 9 0 % であるアミノ酸配列を有するネズミ C X C L 1 2 - 1 、

(i i) 配列番号 6 もしくは 5 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一
 性が少なくとも 9 0 % であるアミノ酸配列を有するヒト C X C L 1 2 - 1 、

(i i i) 配列番号 9 もしくは 8 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一
 性が少なくとも 9 0 % であるアミノ酸配列を有するネズミ C X C L 1 7、

(i v) 配列番号 1 2 もしくは 1 1 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配
 列同一性が少なくとも 9 0 % であるアミノ酸配列を有するヒト C X C L 1 7、

(v) 配列番号 1 5 もしくは 1 4 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列

同一性が少なくとも90%であるアミノ酸配列を有するネズミ Y m 1、及び

(v i) 配列番号 18 もしくは 17 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一性が少なくとも90%であるアミノ酸配列を有するヒト Y m 1 から選択されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 3】

前記プラスミドは、乳酸菌における発現を可能にする 1 つ以上の調節配列を含み、前記調節配列は、乳酸菌から得られるか、または乳酸菌由来である、請求項 1 または 2 に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 4】

前記タンパク質の発現は、調節可能である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 5】

前記プラスミドは、誘導性プロモーターの制御下に、前記タンパク質のうち 1 つ以上をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 6】

前記プラスミドは、乳酸菌のナイシンレギュロン、サカシン A レギュロン、またはサカシン P レギュロン由来の誘導性プロモーターおよび調節因子を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 7】

前記誘導性プロモーターは、前記サカシン P レギュロン由来の P o r f X プロモーターである、請求項 5 または 6 に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 8】

前記プラスミドは、配列番号 20 の配列を有する p S I P 4 1 1 と呼ばれるプラスミド由来である、請求項 1 に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 9】

前記タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列は、乳酸菌における発現のためにコドン最適化されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 10】

前記プラスミドは、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、および配列番号 16 の配列を含むヌクレオチド配列、ならびに前記配列との配列同一性が少なくとも90%であるヌクレオチド配列を有する群から選択される1つ以上のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 11】

前記局所用医薬組成物が創傷被覆材の形態である請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の局所用医薬組成物。

【請求項 12】

皮膚創傷の治癒における局所使用のための医薬キットであって、該キットは、

(i) 請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のプラスミドで形質転換されている乳酸菌であって、前記プラスミドは、乳酸菌において前記タンパク質を発現可能な誘導性プロモーターの制御下に、前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、乳酸菌と、

(i i) 前記プロモーターのための誘導物質とを含む、キット。

【請求項 13】

皮膚創傷の治癒における局所使用のための医療器具であって、前記医療器具は、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の乳酸菌を含む、医療器具。

【請求項 14】

前記乳酸菌は、凍結乾燥されている、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記キットは、前記凍結乾燥した乳酸菌を再懸濁するための液体をさらに含む、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

前記液体は、前記誘導物質を含有する、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

前記キットは、前記乳酸菌を含有する創傷被覆材を含む、請求項 12、14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 18】

前記キットは、創傷被覆材をさらに含む、請求項 12、14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、組み換えプラスミドに関し、特に、乳酸菌細胞を形質転換した際に、免疫細胞を標的とする組み換えタンパク質を発現することができ、該タンパク質は、ネズミおよびヒトの CXC L 12 1、CXC L 17 および Y m 1 からなる群から選択される、プラスミドに関する。さらに、本発明は、前記プラスミドで形質転換した乳酸菌、ならびにヒトおよび動物の創傷治癒における該乳酸菌の使用に関する。

【0002】

創傷治癒のプロセスは、互いに重複する段階（凝固期、炎症期、および増殖／再構築期）を有しており、その各段階では、局所的な微環境の構成要素が経時的に変化し、異なる細胞種が異なる役割を果たしている。治癒プロセスに関係する細胞で重要なものは、血小板、ケラチン生成細胞／上皮細胞、線維芽細胞／筋線維芽細胞、種々の免疫細胞、および内皮細胞である。体内の組織は、すべて傷付けられ得、治癒プロセスはいくらか臓器特異的であるが、損傷を受けた細胞は、類似した初期シグナルを誘発する。最も研究されている創傷治癒の態様は、肌におけるものである。

【0003】

組織の損傷はホメオスタシスを混乱させるが、これによって凝固プロセスが開始されて交感神経系が活性化される。血栓（blood clot）を形成する血小板がシグナルを放出し、主に PDGF（血小板由来成長因子）および TGF（トランスフォーミング成長因子）により、局所環境が変化する（参考文献 1）。損傷を受け、かつストレスを受けた細胞は、好中球や単球などの免疫細胞の動員を開始する警報シグナルを放出する。免疫細胞は、傷付いた組織内において、様々なケモカインや、VEGF-A、FGF および EGF（血管内皮成長因子 A、線維芽細胞成長因子、上皮成長因子）などの成長因子、ROS（活性酸素種）、マトリクス消化酵素を分泌し、これによって微環境が変化して、治癒プロセスが、機能しない死んだ組織がマクロファージによって除去される増殖期へと入ることが可能になる。線維芽細胞やケラチン生成細胞などの細胞は、創傷縁部から創傷中心に向かって内部へと移動し、コラーゲンおよび細胞外マトリクスの層で創傷表面を覆う。その後、創傷内の線維芽細胞は、創傷が収縮して最終的に閉鎖することを可能にする収縮性 - SMA（ - 平滑筋アクチン）を発現する筋線維芽細胞へと変化する。線維芽細胞から筋線維芽細胞への変化は、微環境からのシグナルに依存しており、そのシグナルの一部は免疫細胞に由来するものであって、免疫細胞は主にマクロファージである。このプロセスの間に、血管が成長して、新しく形成された組織である肉芽組織となる。一般に、この段階の間に、隣接した領域へ流れる血流が増加することによって、免疫細胞の動員や患部への移動に加えて、酸素および栄養素の可用性が増大する。

【0004】

創傷が閉鎖した後、患部は、ケラチン生成細胞／上皮細胞によって再上皮化され、これによって臓器閉鎖の完全性が回復する。創傷が閉鎖した後であっても、組織の再構築が起こってマトリクス構造が正常化され、関係していた免疫細胞の大部分は死ぬか、その部位から離れる。また、この段階では、死んだ細胞または死にそうな細胞は、残った組織マク

10

20

30

40

50

ロファージに取り込まれて除かれる（貪食される）（参考文献 1）。素早い創傷治癒によって、合併症や患者の不快感が低減される。

【 0 0 0 5 】

皮膚または粘膜の創傷治癒が損なわれるかまたは遅延することは、痛み、病原体への直接的な曝露、組織機能の喪失、および体温と体液との平衡調節の喪失の原因となる世界的な臨床上の問題である。嚴重に調節されている創傷治癒プロセスが損なわれ、通常よりも長期間、皮膚または粘膜の創傷が治癒されずに残り、最悪の場合は慢性化する異常がいくつか存在する。

【 0 0 0 6 】

特に四肢においては、肌への血流が減少することによって、治癒プロセスの効率が著しく低下する。PAD（末梢動脈疾患）、間欠性跛行、動脈硬化斑による静脈不全または血管閉塞などの、肌の灌流が低下するか血管系の機能が損なわれる病態がいくつか存在する。創傷領域への血流が損なわれると、酸素および栄養素が不足し、組織の再構築の助けとなる細胞が壊死によって死ぬか、その場においてその役割を果たすことができなくなる。また、周囲の組織も、酸素および栄養素が十分に供給されない場合は、機能性を喪失し、最後には死んでいく。組織は、再構築期の間、代謝的に非常に活発化しており、酸素の消費量は高い。

【 0 0 0 7 】

皮膚の創傷治癒を損なわせる別の要因は、高血糖症および糖尿病である。高血糖状態では、細胞シグナル伝達および免疫系の機能が損なわれる。糖尿病に起因する合併症としては、微小血管の変化および末梢ニューロンの障害が挙げられる。その結果、糖尿病患者は、その足に、一般に糖尿病性足病変と呼ばれる慢性創傷を発症することが多い。現在、このような患者に対して利用可能な治療は、全身抗生物質処理および閉鎖創傷被覆材とともに、外科的創傷清拭またはコラゲナーゼを用いて死組織を除去することである。成長因子および生体適合材料を慢性創傷に適用する実験研究が行われている（参考文献 2）。

【 0 0 0 8 】

C - X - C モチーフケモカイン 1 2（CXCL12）としても知られている間質細胞由来因子 1（SDF - 1）は、ヒトにおいて、CXCL12 遺伝子にコードされたケモカインタンパク質である。国際公開公報第 2 0 0 9 / 0 7 9 4 5 1 号には、対象体（subject）の創傷治癒を促進する方法であって、対象体の創傷治癒を促進するのに有効な量の SDF - 1 を、創傷に直接投与するかまたは創傷の近傍領域に投与することを含む、方法が開示されている。

【 0 0 0 9 】

治癒プロセス中、ある特定のプロバイオティクス（ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）ATCC PTA 6475）を飲料水に添加した場合、すなわちその細菌を摂取した場合に、創傷治癒が促進されることが示されている（参考文献 9）。さらに、ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）の培養上清が、慢性創傷に感染していることが一般的である緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）によるバイオフィルムの産生を阻害することが実証されている（参考文献 10）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

驚くべきことに、本発明にしたがって、サイトカインなどの特定のタンパク質を発現するように改変された乳酸菌が、創傷治癒の促進に有用であることが見出された。乳酸菌は、ヒトの肌にまばらに存在しており（参考文献 13）、肌における治療介入に用いられる細菌として期待される選択肢ではない。ラクトバチルス属は、大腸菌（*E. coli*）および黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）のようなより一般的に用いられる細菌と比較して、相対的に成長が遅く、また特別な培地を必要とするため、取り扱いが難しい。さらに、ラクトバチルス属においては、転写、翻訳、およびタンパク質フォールディングのための細胞内装置が限定されている。このため、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、この

10

20

30

40

50

特定の細菌株に合うように最適化されなければならない。

【0011】

創傷治癒の異なる段階には、それぞれ、変更されることで治癒プロセスを変化させることができる重要な事象が含まれる。治癒プロセス中の血管再構築は、VEGF-A（血管内皮成長因子A）の発現やCXCL12（SDF-1としても知られている；配列番号3および6）などの一連のケモカインの発現を調節する低酸素誘導因子1（HIF-1）の誘導に大きく依存している。CXCL12は、組織において恒常的に発現され、白血球および内皮細胞に見出される受容体CXCR4を介して作用し、複数の細胞作用を引き起こす（参考文献3）。CXCL12は、組織の再構築に特化したマクロファージにおいて、高レベルで見出される（参考文献4）。レンチウイルスベクターを用いて、CXCL12を真皮で過剰発現させると、糖尿病マウスにおいて創傷治癒が改善した（参考文献5）。

10

【0012】

最近発見された別のケモカインはCXCL17（配列番号9および12）であり、これは、組織マクロファージの表現型にCXCL12と同様の影響を及ぼす。CXCL12と同様、CXCL17は、細胞培養において測定されるVEGF-Aと同時調節される（参考文献6）。CXCL17は、主に粘膜組織に見出され、同様に肌に見出される病原性細菌に対して直接抗菌性を発揮する一方、ラクトバチルス・カゼイ（*Lactobacillus casei*）の生存には影響を及ぼさないことが報告されている（参考文献7）。

20

【0013】

さらなる重要なタンパク質は、Ym1（配列番号15および18）であり、これは、キチナーゼ様タンパク質である。キチンは、細菌性バイオフィルムにおける一般的な多糖である。Ym1は、バイオフィルムの生成の抑制と、組織再構築および創傷治癒に重要なマクロファージ機能の誘導との両方を行い、また、血管細胞と上皮細胞のどちらにも取り込まれないので、マクロファージ特異的である（参考文献8）。

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、第1の態様において、本発明は、乳酸菌において（すなわち、乳酸菌細胞を形質転換した際に）タンパク質を発現可能な組み換えプラスミドであって、該タンパク質は、ヒトおよび動物対象体において、皮膚または粘膜の創傷治癒などの創傷治癒を改善させるのに有用なものである、組み換えプラスミドを提供する。該タンパク質は、好ましくは、マクロファージなどの免疫細胞およびその前駆体を標的とする能力によって、創傷治癒に有用である。該タンパク質は、好ましくは、サイトカインまたはケモカインである。最も好ましくは、該タンパク質は、ネズミCXCL12、特にネズミCXCL12-1（配列番号3）；ヒトCXCL12、特にヒトCXCL12-1（配列番号6）；ネズミCXCL17（配列番号9）；ヒトCXCL17（配列番号12）；ネズミYm1（配列番号15）；およびヒトYm1（配列番号18）からなる群から選択される。

30

【0015】

より具体的には、本発明の第1の態様は、乳酸菌において（すなわち、乳酸菌細胞を形質転換した際に）組み換えタンパク質を発現可能なプラスミドであって、該プラスミドは、CXCL12、CXCL17、およびYm1から選択されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、プラスミドを提供する。

40

【0016】

より具体的には、ヌクレオチド配列は、ネズミCXCL12、特にネズミCXCL12-1；ヒトCXCL12、特にヒトCXCL12-1；ネズミCXCL17；ヒトCXCL17；ネズミYm1；またはヒトYm1をコードしていてもよい。

【0017】

一実施形態において、プラスミドは、配列番号3もしくは2に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するネズミCXCL12-1；配列番号6もしくは5に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列

50

との配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するヒトCXC L 12 - 1 ; 配列番号9もしくは8に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するネズミCXC L 17 ; 配列番号12もしくは11に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するヒトCXC L 17 ; 配列番号15もしくは14に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列との配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するネズミY m 1 ; および配列番号18もしくは17に示されるアミノ酸配列またはこの配列との配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するヒトY m 1、から選択されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0018】

10

より具体的には、プラスミドは、乳酸菌においてタンパク質を発現するのに用いられ、したがって、このような使用のために提供されるか、またはこのような使用に適合される(例えば、乳酸菌における特異的な使用または特定の使用のために、設計、選択、適合、または改変される)。したがって、一実施形態において、プラスミドは、広く細菌または微生物と比較すると、乳酸菌における特異的な発現のためのものである。プラスミドは、調節因子(調節配列)および/または、例えば、乳酸菌における発現のために選択または改変されたコード配列によって、乳酸菌における発現に適合されてもよい。

【0019】

したがって、より具体的な態様において、プラスミドは、乳酸菌において、発現を可能にするかまたは発現に特異的である1つ以上の調節(すなわち、発現制御)配列を含む。したがって、プラスミドは、乳酸菌における発現由来の発現制御配列、または乳酸菌における発現に適した発現制御配列、または乳酸菌における発現に特異的な発現制御配列を含んでいてもよい。適切な発現制御配列は、例えば、翻訳制御因子(例えば、開始コドンおよび終止コドン、リボソーム結合部位)および転写制御因子(例えば、プロモーター-オペレーター領域、終結配列)を含み、発現されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列に一致する読み枠に連結されている。調節配列は、タンパク質の発現を駆動または制御するように、タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。プラスミドは、乳酸菌細胞に導入されてもよい。適切な形質転換技術は、文献に詳しく記載されている。細菌の細胞は、培養されてもよいし、そうでなければ、プラスミドからの前記タンパク質発現を可能にする条件下で維持されてもよい。これは、対象体の創傷内の条件を含み得る。

20

30

【0020】

一実施形態において、タンパク質の発現を制御するプラスミドプロモーターは、乳酸菌における発現を可能にするプロモーターまたは乳酸菌における発現に特異的なプロモーターである。したがって、プラスミドは、乳酸菌においてタンパク質を発現可能なプロモーターの制御下に(すなわち、作動可能に連結された)、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。特に好適な実施形態において、プラスミドは、乳酸菌プロモーターを含む。すなわち、タンパク質の発現を制御するプロモーターは、乳酸菌由来のプロモーターであり、つまり、より具体的には、乳酸菌において発現される遺伝子から得られるかまたはそれに由来するプロモーターである。

40

【0021】

ある実施形態において、プラスミドは、乳酸菌プロモーターに加えて、乳酸菌から得られるかまたはそれに由来する他の調節因子または調節配列を含むことによって、タンパク質の発現を制御してもよい。したがって、例えば、このような他の乳酸菌発現制御因子または乳酸菌発現制御配列は、エンハンサー、ターミネーターおよび/または上述した翻訳制御因子または翻訳制御配列を含んでいてもよい。ある実施形態において、プラスミドは、以下でさらに述べるように、オペレーター配列などのプロモーター、または1つ以上の調節遺伝子からの発現を制御または調節する調節因子または調節配列を含んでいてもよい。

【0022】

50

あるいは、または、さらに、プラスミドは、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が乳酸菌における発現のためにコドン最適化 (codon-optimised) されることによって、乳酸菌における使用に適合 (または、改変など) されてもよい。

【0023】

好適な実施形態において、タンパク質発現のプロモーターは、調節性 (調節可能) プロモーターまたは誘導性プロモーターである。したがって、プロモーターを活性化または有効化 (誘導) する調節分子または誘導物質を、細菌に与えるかまたは接触させることによって、タンパク質の発現を制御または調節 (例えば、所望の時間または適切な時間に、開始するなど) してもよい。このことは、タンパク質の創傷への送達に関して有利である。

【0024】

したがって、本発明のさらなる態様は、乳酸菌におけるタンパク質の発現に用いる発現系を提供し、該発現系は、(i) 乳酸菌において前記タンパク質を発現可能な誘導性プロモーターの制御下に、前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、本明細書で定義されるプラスミドと; (ii) プロモーターの誘導物質 (または調節分子) とを含む。発現系は、好都合なことには、上記の構成要素 (i) および (ii) を含むキットの形態で提供され得る。

【0025】

本発明のまたさらなる態様は、本明細書で定義される本発明のプラスミドで形質転換した (すなわち、プラスミドを含有する) 細菌 (すなわち、細菌細胞または細菌株) である。特に、細菌は乳酸菌であり、したがって、本発明は、本明細書で定義される本発明のプラスミドを含有する乳酸菌を提供する。別の表現では、本発明の本態様は、本発明のプラスミドが導入された細菌 (または細菌細胞) を提供する。

【0026】

本明細書でさらに述べるように、本発明のプラスミドおよび細菌は、治癒を促進するのに有用であり、したがって、損傷を受けた組織を広く含むと本明細書で定義される (さらに以下を参照) 創傷の治癒を促進するのに特に有用である。したがって、本発明のさらなる態様は、治療における使用のための、より具体的には、創傷治癒における使用のための、このようなプラスミドおよび細菌を提供する。

【0027】

治療を受けるべき対象体の創傷に医薬組成物の形態で投与するために、細菌が提供されてもよい。したがって、本発明のまたさらなる態様は、本明細書で定義される本発明の細菌を、医学的に許容される少なくとも1つの担体または賦形剤とともに含む医薬組成物を提供する。

【0028】

より一般的には、本発明は、本発明の細菌を含むプロバイオティクス製品を提供する。

【0029】

このような製品、または医薬組成物は、好都合なことには、本発明の細菌を含む創傷被覆材 (wound dressing) の形態をとり得る。したがって、さらなる態様において、本発明は、先に定義した本発明の細菌を、少なくとも1つの被覆材料とともに含む創傷被覆材を提供する。

【0030】

本発明のまたさらなる態様は、創傷治癒に用いる医薬品 (またはプロバイオティクス製品) の製造のための、本明細書で定義される本発明のプラスミドまたは細菌の使用を提供する。

【0031】

また、対象体を治療して創傷を治癒させる方法も提供され、該方法は、創傷の治癒を促進するのに有効な量の本明細書で定義される本発明の細菌を、該対象体または該対象体の創傷に投与することを含む。

【0032】

本発明の別の態様は、創傷治癒のためのキットを提供し、該キットは、

10

20

30

40

50

(i) 乳酸菌において前記タンパク質を発現可能な誘導性プロモーターの制御下に、前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、本明細書で定義されるプラスミドと、
(i i) プロモーターの誘導物質（または調節分子）とを含む。

【 0 0 3 3 】

本発明のまたさらなる態様は、医薬製品（例えば、キットまたは組み合わせ製品）を含み、該医薬製品は、

創傷治癒における単独使用、順次使用、または同時使用のための（または、対象体の創傷を治療するための）組み合わせ製剤として、

(i) 乳酸菌において前記タンパク質を発現可能な誘導性プロモーターの制御下に、前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、本明細書で定義されるプラスミドを含む乳酸菌と、

(i i) プロモーターの誘導物質（または調節分子）とを含む。

【 0 0 3 4 】

本明細書において、「創傷治癒」なる語は広く用いられ、創傷の治癒を促進または改善させるいかなる態様も含む。したがって、上記説明した本発明の様々な態様は、あるいは、創傷治癒を促進、増強または改善させる際の、プラスミドまたは細菌の有用性に関して定義されてもよいし、単に治癒を促進または増強することに関して定義されてもよい。

【 0 0 3 5 】

したがって、創傷治癒は、より速い創傷治癒をもたらすか、創傷のより全面的な治癒をもたらすか、あるいは実際には、創傷の治癒の改良または改善をもたらす、いかなる効果をも含むか、または包含していてもよく、その例として、創傷を部分的または全面的に閉鎖するのにかかる時間を短縮するなどの治癒時間の短縮や、創傷の外見（例えば、治癒した創傷の外見または治癒途中の創傷の外見）の改善、傷痕形成の抑制または改善、慢性創傷または不応性創傷の治癒の促進などが挙げられる（すなわち、本発明の細菌を創傷に適用することによって、これまで治癒しなかった、または治癒の兆候を示さなかった創傷の治癒が誘導されるか、引き起こされるか、または開始され得る）。創傷については、以下でより詳細に述べる。

【 0 0 3 6 】

治療されるべき創傷を有する対象体は、ヒト対象体であってもよいし、飼育慣らされた動物や家畜、実験動物、スポーツ用の動物、動物園の動物などを含む、動物対象体であってもよい。動物は、好ましくは哺乳動物であるが、鳥類などの他の動物も含まれる。したがって、動物は、霊長類、齧歯類（例えば、マウスまたはラット）、ウマ、イヌまたはネコであり得る。最も好ましくは、対象体はヒトである。

【 0 0 3 7 】

乳酸菌（L A B）すなわちラクトバチルス目は、共通の代謝特性および生理学的特性を有する、グラム陽性、低G C、酸耐性で、一般に非孢子形成性であり、非呼吸性である、桿状（桿菌）または球状（球菌）の細菌の単系統である。この細菌は、炭水化物発酵の主な代謝最終産物として乳酸を産生し、また酸性度（低p H範囲）に対する耐性が高いことを特徴とする。L A Bは、有機酸の産生（例えば、乳酸）による酸性度の上昇に耐性があるので、この特性によって、自然発酵において他の細菌を排除することが可能になる。したがって、酸性化によって腐敗原因物質の増加が阻害されるので、L A Bは食品発酵において重要な役割を担っている。L A Bのうちいくつかの株は、腐敗および病原性微生物の増殖をさらに阻害するタンパク質性のバクテリオシンも産生する。L A Bは、一般に安全と認められた（G R A S）ものであり、食品産業で用いられる最も重要な微生物群に含まれる。

【 0 0 3 8 】

乳酸菌の単系統を含む中核的な属は、ラクトバチルス属（Lactobacillus）、ロイコノストック属（Leuconostoc）、ペジオコッカス属（Pediococcus）、ラクトコッカス属（La

10

20

30

40

50

ctococcus) およびストレプトコッカス属 (Streptococcus) であり、さらに、より周辺的なものとしてアエロコッカス属 (Aerococcus)、カルノバクテリウム属 (Carnobacterium)、エンテロコッカス属 (Enterococcus)、オエノコッカス属 (Oenococcus)、スポロラクトバチルス属 (Sporolactobacillus)、テトラジェノコッカス属 (Tetragenococcus)、バゴコッカス属 (Vagococcus) およびワイセラ属 (Weissella) である。これらの属の乳酸菌はいずれも、本発明の範囲に含まれるが、特にラクトバチルス属またはラクトコッカス属の細菌である。

【0039】

プラスミドは、タンパク質を1つ以上コードしていてもよい。したがって、C X C L 1 2 タンパク質、C X C L 1 7 タンパク質および/またはY m 1 タンパク質の組み合わせ (例えば、C X C L 1 2、C X C L 1 7 またはY m 1 を2つ以上) をコードしていてもよい。あるいは、2種以上のC X C L 1 2 タンパク質、C X C L 1 7 タンパク質および/またはY m 1 タンパク質 (例えば、ネズミC X C L 1 2 とヒトC X C L 1 2 の両方など) をコードしていてもよい。複数のタンパク質がコードされている場合、タンパク質を単一プロモーターの制御下にコードするヌクレオチド配列からタンパク質が発現されてもよいし、複数のプロモーターを用いてもよい。例えば、各タンパク質は、同一であっても異なってもよい別々のプロモーターから発現されてもよい。同一プラスミドから2つ以上のタンパク質と一緒に発現する技術は、当該技術分野において公知であって、例えば、翻訳連結技術などが挙げられ、これを実現する手段は当該技術分野において公知であり、また利用可能である。例えば、P 2 A 配列およびT 2 A 配列を用いた1つのプロモーター下で、複数の導入遺伝子を同時に発現することができる。

【0040】

C X C L 1 2 タンパク質、C X C L 1 7 タンパク質またはY m 1 タンパク質は、天然タンパク質 (すなわち、ヌクレオチド配列が、天然で見られるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしていてもよい) であってもよく、これらのタンパク質が存在するどのような種に由来していてもよい。一般的に、タンパク質は、哺乳動物のタンパク質であり、上述したように、ヒトおよびネズミのタンパク質が好適である。しかしながら、天然のヌクレオチド配列またはタンパク質配列は、タンパク質の機能または活性が、実質的に、または著しく、変化しない限りにおいて、例えば、タンパク質の活性が実質的に維持される限りにおいて、例えば1つ以上のアミノ酸の付加、挿入、欠失および/または置換などによって改変されていてもよい。タンパク質は、天然タンパク質の断片変異体であってもよいし、短縮変異体であってもよい。例えば、配列改変変異体タンパク質は、それが由来する親タンパク質活性の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の活性を示し得る。このことについては、当該技術分野において公知の、当該タンパク質の活性についての試験にしたがって評価し得る。例えば、タンパク質で処理した培養細胞におけるライゲーション時の受容体リン酸化またはカルシウムの流入システムや、感染タンパク質に対する細胞動員モデルにおけるインビトロまたはインビボでの細胞走化性システムにおいて、活性を測定することができる。走化性に基づくインビトロでのアッセイについては、参考文献22および32に記載されている。さらに、参考文献33では、用いられ得るインビトロでのケモカイン活性試験について記載されている。したがって、「C X C L 1 2」、「C X C L 1 7」または「Y m 1」なる語は、天然タンパク質だけでなく、機能的に等価な天然タンパク質の変異体または誘導体も含む。したがって、タンパク質は、合成変異体であっても、配列改変変異体であってもよく、翻訳後修飾などの他の改変を1つ以上含んでいてもよい。

【0041】

上記した通り、コードされたタンパク質は、天然のヒトタンパク質またはネズミタンパク質に対する上述したアミノ酸配列、すなわち、それぞれネズミC X C L 1 2 およびヒトC X C L 1 2 に対する配列番号3および6、それぞれネズミC X C L 1 7 およびヒトC X C L 1 7 に対する配列番号9および12、およびそれぞれネズミY m 1 およびヒトY m 1 に対する15および18、からなるものであってもよいし、前記配列のいずれかとの配列

同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するものであってもよい。有利には、さらに上記したとおり、これらの天然タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、乳酸菌での発現のためにコドン最適化されていてもよい。これによって、改変されたタンパク質のアミノ酸配列がコードされる。例えば、コドン最適化された配列は、乳酸菌に適した（または、より向いている）分泌配列などの配列をコードしていてもよい。したがって、コドン最適化されたヌクレオチド配列にコードされた「最適化された」タンパク質は、天然タンパク質と比較して、変化または置換されたリーダー配列またはシグナル配列（例えば、分泌配列）を含んでいてもよい。好適な実施形態において、コドン最適化された配列にコードされたタンパク質の成熟した形態または切断された形態は、天然タンパク質と同一である。コドン最適化されたヌクレオチド配列にコードされたタンパク質は、下記表ⅠⅤに挙げた配列番号2、5、8、11、14、または17に示されるアミノ酸配列を有するものであってもよい。したがって、プラスミドにコードされたタンパク質は、それぞれネズミCXC L 12およびヒトCXC L 12に対する配列番号2および5、それぞれネズミCXC L 17およびヒトCXC L 17に対する8および11、およびそれぞれネズミYm1およびヒトYm1に対する14および17、に示されるアミノ酸配列を有するものであってもよいし、前記配列のいずれかとの配列同一性が少なくとも80%であるアミノ酸配列を有するものであってもよい。

10

【0042】

他の実施形態において、コードされたタンパク質は、前記アミノ酸配列のいずれかとの配列同一性が、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%であるアミノ酸配列を有するものであってもよい。

20

【0043】

配列同一性は、当該技術分野において公知で、容易に利用可能な方法およびソフトウェアによって、容易に決定され得る。したがって、配列同一性は、どのような簡便な方法で評価されてもよい。しかしながら、配列間の配列同一性の程度を求めるためには、例えばC l u s t a l Wなどの、複数の配列を整列させるコンピュータプログラムが有用である（参考文献24）。A L I G N（参考文献25）、F A S T A（参考文献26および参考文献27）、B L A S Tおよびg a p p e d B L A S T（参考文献28）のような、配列対を比較して整列させるプログラムも、この目的において有用であり、初期設定で用いられてもよい。さらに、欧州バイオインフォマティクス研究所のD a l iサーバにおいて、構造に基づいたタンパク質配列の整列が提供されている（参考文献29、参考文献30および参考文献31）。複数配列の整列および同一性パーセントの算出は、標準的なB L A S Tのパラメータを用いて（例えば、有効な全ての生物の配列と、マトリクスとしてB l o s u m 6 2と、ギャップコストとしてe x i s t e n c e 1 1、e x t e n s i o n 1とを用いて）決定されてもよい。あるいは、以下のプログラムおよびパラメータが用いられてもよい：プログラム：A l i g n P l u s 4、バージョン4.10（S c i E d C e n t r a l C l o n e M a n a g e r P r o f e s s i o n a l S u i t e）；DNA比較：全体比較、標準的直線スコアリングマトリクス、不一致ペナルティ=2、オープンギャップペナルティ=4、延長ギャップペナルティ=1；アミノ酸比較：全体比較、B L O S U M 6 2スコアリングマトリクス。

30

40

【0044】

本明細書で定義される天然に存在するポリペプチド配列の変異体は、例えば、部位特異的変位導入またはランダム変位導入（例えば、遺伝子シャッフリング（gene shuffling）またはエラープロードPCRを用いる）などの標準的な変位導入技術など、当該技術分野において公知の標準的な分子生物学的技術を用いることなどによって、合成的に生成させることができる。

50

【 0 0 4 5 】

また、本明細書で定義されるタンパク質の誘導体がコードされていてもよい。誘導体とは、アミノ酸が、例えばグリコシル化などによって化学的に改変されている上述したタンパク質またはその変異体を意味する。

【 0 0 4 6 】

タンパク質が、天然タンパク質の配列に対してアミノ酸置換を含む場合、その置換は、好ましくは、保存的置換であり得る。「保存的アミノ酸置換」なる語は、アミノ酸が、類似の物理化学的性質を有するアミノ酸、すなわち同じ分類／群のアミノ酸と入れ替わった（置換された）アミノ酸置換のことをいう。例えば、小さい残基であるグリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）またはスレオニン（T）；疎水性または脂肪族残基であるロイシン（L）、イソロイシン（I）、バリン（V）またはメチオニン（M）；親水性残基であるアスパラギン（N）およびグルタミン（Q）；酸性残基であるアスパラギン酸（D）およびグルタミン酸（E）；正に荷電した（塩基性）残基であるアルギニン（R）、リシン（K）またはヒスチジン（H）；あるいは芳香族残基であるフェニルアラニン（F）、チロシン（Y）およびトリプトファン（W）が、タンパク質の機能または活性を実質的に変化させることなしに、区別なく置換され得る。

【 0 0 4 7 】

上述したように、タンパク質の発現には、誘導性プロモーターを用いることが好適である。「誘導性の」とは、その機能（すなわち、活性、つまりコードしているヌクレオチド配列の転写を可能にするかまたは引き起こす効果）を調節または制御することができるプロモーターを意味する。したがって、「誘導性の」なる語は、「調節可能な」（または、「調節性の」）と同義であり、これと区別なく用いられ得る。よって、タンパク質の構成的発現はない。したがって、タンパク質の発現は、誘導され得る、つまり有効化され得る（または、より具体的には、有効化および無効化され得る）。より具体的には、発現は、限られた時間または規定された時間、誘導され得る、つまり有効化され得る。これは、発現がある期間後に終わるから、および／または細菌細胞が死ぬからであり得る。

【 0 0 4 8 】

ある実施形態において、プロモーターが誘導される（別の用語では、活性化される）まで、プロモーターからの発現（転写）は起こり得ない。しかしながら、いずれの生物系の場合とも同様に、活性の欠如は完全なものではあり得ず、プロモーター活性またはプロモーターの誘導がない場合でも、基礎的なプロモーター活性がいくらかあり得る。しかしながら、好適な実施形態においては、未誘導プロモーターの基礎的発現は低いか、最小限であるか、微々たるものであり、あるいは、より好ましくは、僅少であるか無視できるくらいのものである。したがって、誘導性プロモーターからの発現は、プロモーターが誘導された場合、誘導されていない場合のプロモーターと比較して、有利には、ある程度、または明確に増加する。

【 0 0 4 9 】

誘導性プロモーターは当該技術分野において公知であって、乳酸菌で使用するための誘導性プロモーターを含み、乳酸菌での発現に適した適切ないずれの誘導性プロモーターが用いられ得る。

【 0 0 5 0 】

誘導性プロモーターは、プロモーターに直接的または間接的に作用し得、添加されることでプロモーターを誘導し得るか、または、より一般的には、プロモーターの活性化を引き起こすかまたは可能にしてタンパク質の発現を可能にする誘導物質または活性剤分子の存在下で誘導（または活性化）され得るか、あるいは、プラスミドを含有する細菌の状況変化によって、例えば、特定の栄養素の飢餓状態または減少状態などの状況変化を乳酸菌にもたらすことによって誘導（または活性化）され得る。プロモーターの誘導物質は、一実施形態においてそれ自体が誘導または活性化され得る調節遺伝子によってコードされていてもよい。したがって、「誘導物質」なる語は、本明細書において広く用いられ、誘導性プロモーターを活性化するかまたは有効化し得る、あるいは誘導性プロモーターの誘導

を可能にするかまたは引き起こす調節分子、またはこれらを実際に許容する状況を含む。したがって、誘導性プロモーターの誘導は、調節分子を導入すること（例えば、プラスミドを含有する乳酸菌を接触させること）、またはプロモーターの誘導（活性化）を許容する状況を導入することを含んでいてもよい。ある実施形態において、誘導物質は、活性化ペプチドであり得る。これは、例えば、さらに以下で述べるように、プロモーターを直接的または間接的に誘導するように作用し得る。

【0051】

上述したように、乳酸菌から得られたかまたは乳酸菌に由来するプロモーターが好適である。これらは、天然プロモーターであってもよいし、改変プロモーターまたは変異型プロモーターであってもよい。適当なプロモーターは、例えば、創傷において乳酸菌を成長させること、および創傷における細菌においてどの遺伝子が発現または上方制御されているのかを決定することによって、特定され得る。その後、このような遺伝子からプロモーターが特定され得る。あるいは、当該技術分野において、乳酸菌における、または乳酸菌のための、いくらかの異なるプロモーターおよび発現系が特定および説明され、または使用可能となっており、これは、乳酸菌で使用するためのこのようなプロモーターまたは発現系を含む発現プラスミドを含む。このような公知のプラスミドまたは発現系は、本発明の組み換えプラスミドの基礎として用いられ得る。

【0052】

ラクトバチルス属などのLABで用いられる様々な誘導性発現系が、当該技術分野において公知である。一例として、参考文献19に記載のL. plantarum NC8 (plantarum NC8) のマンガン輸送体由来のマンガン飢餓誘導性プロモーターに基づく自己誘導系が挙げられる。この系は、組み換えタンパク質の産生に、外部誘導物質の添加を必要としない。

【0053】

Duongら（参考文献20）は、広範囲のpWV01レプリコンに基づいた乳酸桿菌で用いられる発現ベクターであって、フラクトオリゴ糖（FOS）、ラクトースまたはトレハロースの代謝または輸送に関わる、あるいは解糖作用に関わるオペロン由来のプロモーターを含む、ベクターについて述べている。このようなプロモーターは、特定の炭水化物によって誘導され、グルコースによって抑制され得る。

【0054】

より具体的には、誘導性発現系は、LABタンパク質、特にバクテリオシンの産生に関わる誘導性プロモーターを含み得る。このようなプロモーターの活性は、バクテリオシンレギュロンに基づく同系の調節系、例えば、外部から添加された活性化ペプチド（すなわち、ペプチド形態の誘導物質/調節分子）ならびにヒスチジンタンパク質キナーゼ、および活性化ペプチドによる誘導時に本プロモーターを活性化するのに必要な応答調節因子をコードする遺伝子に応答する二成分調節（シグナルトランスダクション）系などによって制御され得る。

【0055】

一実施形態において、発現系は、nisAプロモーターおよびnisRK調節遺伝子の組み合わせに基づくナイシン制御発現（NICE）系に基づいたものであってもよい。この系は、ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）のナイシン遺伝子群由来のプロモーターおよび調節遺伝子に基づいており、これを用いて、乳酸球菌、乳酸桿菌、および他のグラム陽性細菌のための調節型遺伝子発現系が開発されている（参考文献15および参考文献21において簡単に考察されている）。NICE系は、乳酸球菌において効率がよく、またよく調節されるが、この系は、顕著な基礎的活性を発揮し得る。このことは、ヒスチジンキナーゼ遺伝子および応答調節因子遺伝子を染色体に組み込み、特別に設計された宿主株に発現系を限定することによって回避することができる。

【0056】

別の実施形態において、発現系は、クラスIIバクテリオシンであるサカシンA（sap遺伝子）のサカシンAレギュロンによる産生、またはサカシンP（spp遺伝子）のサ

10

20

30

40

50

カシンプレギュロンによる産生に関わる遺伝子およびプロモーターに基づくものであってもよい。このようなベクターは、pSIPベクターとして知られており、サカシンAまたはサカシンPいずれかの構成遺伝子由来のプロモーターエレメントを、翻訳融合クローニング用に設計されたNcoI部位とともに含む。レギュロン由来の異なるプロモーターおよび/または異なるレプリコンを含む様々なこのようなベクターは、参考文献21および参考文献15に記載があり、これらのベクターのいずれかを、本発明の組み換えプラスミドの基礎として用いることができる。

【0057】

代表的な実施形態において、プロモーターは、サカシンAレギュロンまたはサカシンプレギュロン由来のP_{sapA}、P_{sppA}またはP_{oriX}プロモーターであって、関連調節遺伝子または同系の調節遺伝子を含むものであってもよい。

10

【0058】

特に好適な実施形態において、プラスミドは、図12に示されかつ参考文献21に記載されているベクターpSIP411に基づき、pSH71レプリコン、サカシンプレギュロン由来P_{oriX}プロモーター、および同系の調節遺伝子を含む。プラスミドpSIP411は、本出願においてはpLAB112と呼ばれる。このような実施形態において用いられる誘導物質は、好ましくは、ペプチドSppIPに基づいた活性化ペプチドであり、例えば、配列番号19の配列またはその配列との配列同一性が少なくとも80%（より具体的には、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%）であるアミノ酸配列を有する活性化ペプチドである。好適な実施形態において、該組み換えプラスミドは、配列番号20に示すヌクレオチド配列を有するpLAB112と呼ばれるプラスミド由来である。

20

【0059】

誘導性プロモーター（または誘導性発現系）の使用によって、創傷環境（wound setting）において、すなわち、対象体または創傷に細菌が投与された際に、タンパク質の発現がより制御され、特に長期にわたるようになるという利点が提供され得る。より優れた創傷治癒促進効果のためには、創傷部位（例えば、創傷表面）において、しばらくの間、例えば、少なくとも40分、少なくとも45分、少なくとも50分、少なくとも55分、または少なくとも60分、特に1時間以上、細菌によってタンパク質を発現させることが有利である。したがって、タンパク質は、限られた期間、規定された期間、または長期間、発現されてもよい。下記実施例に示す結果は、本発明に係るプラスミドおよび細菌を用いると、タンパク質が、創傷表面において約1時間発現され得ることを示す。ある実施形態において、プラスミドおよび細菌は、2時間、3時間、または4時間以上、（例えば、創傷において）タンパク質が発現されるように最適化されていてもよい。

30

【0060】

したがって、タンパク質の連続的な発現および送達が望ましく、これは、本発明の形質転換細菌を用いることによって可能になり得る。「連続的な」または「長期間の」は、ある期間、例えば、少なくとも1時間（または、上述の通り）、タンパク質が発現され、それから送達されることを意味する。特に、これによって、タンパク質の直接投与（すなわち、細菌による発現によらないタンパク質製品）と比較して、長い期間タンパク質を有効にすることが可能となる。

40

【0061】

上述したように、タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、LABにおける発現のためにコドン最適化されていてもよい。したがって、好適な実施形態において、組み換えプラスミドにおけるタンパク質をコードするヌクレオチド配列（すなわち、挿入断片）は、ネズミCXCL12、ヒトCXCL12、ネズミCXCL17、ヒトCXCL17、ネズミYm1、およびヒトYm1をそれぞれコードしている配列番号1、4、7、10、13、および16で示されるコドン最適化されたヌクレオチド配列、またはこれらとの配列同一性が少なくとも80%であるヌクレオチド配列から選択され得る。

【0062】

50

したがって、代表的な実施形態において、組換えプラスミドは、配列番号1で示されるヌクレオチド配列を含むmLrCK1と呼ばれるプラスミド、配列番号1で示されるヌクレオチド配列を含むmLrCK1.4と呼ばれるプラスミド、配列番号1で示されるヌクレオチド配列を含むmLrCK1.7と呼ばれるプラスミド、配列番号4で示されるヌクレオチド配列を含むhLrCK1と呼ばれるプラスミド、配列番号7で示されるヌクレオチド配列を含むmLrCK2と呼ばれるプラスミド、配列番号10で示されるヌクレオチド配列を含むhLrCK2と呼ばれるプラスミド、配列番号13で示されるヌクレオチド配列を含むhLrMP1、および配列番号16で示されるヌクレオチド配列を含むmLrMP2と呼ばれるプラスミドからなる群から選択され得る。

【0063】

ある実施形態において、本発明のプラスミドは、以下のコドン最適化された挿入断片、mLrCK1（すなわち配列番号1のヌクレオチド配列）、mLrCK1.4（すなわち配列番号1のヌクレオチド配列）、mLrCK1.7（すなわち配列番号1のヌクレオチド配列）、hLrCK1（すなわち配列番号4のヌクレオチド配列）、mLrCK2（すなわち配列番号7のヌクレオチド配列）、hLrCK2（すなわち配列番号10のヌクレオチド配列）、hLrMP1（すなわち配列番号13のヌクレオチド配列）、およびmLrMP2（すなわち配列番号16のヌクレオチド配列）のヌクレオチド配列との配列同一性が、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%であるヌクレオチド配列を含む。

【0064】

ヌクレオチド分子の配列同一性は、当該技術分野において公知であり、広く使用可能な方法およびソフトウェア、例えば、初期値および可変パムファクターを用い、6ヌクレオチドのウィンドウでギャップ生成ペナルティを12.0、ギャップ延長ペナルティを4.0に設定した、GCGパッケージを用いるFASTA検索によって、求められ得る。

【0065】

ヌクレオチド配列に関するこのような配列同一性は、配列番号1、4、10、13、または16で説明されるヌクレオチド配列と機能的に等価であり得る。このようなヌクレオチド配列は、それぞれCXCL12タンパク質、CXCL17タンパク質、またはYm1タンパク質の機能的な等価物であると見なされるポリペプチドをコードする場合に、機能的に等価であると見なされる。好適な機能的等価物は、上記説明した好適なタンパク質をコードするものである。

【0066】

別の態様において、本発明は、上述した組み替えプラスミドで形質転換した細菌株を提供する。該細菌株は、好ましくは、ラクトバチルス株またはラクトコッカス株（例えば、ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*））などの乳酸菌株である。より好ましくは、細菌株は、ラクトバチルス・ロイテリR2LCまたはラクトバチルス・ロイテリDSM20016などのラクトバチルス・ロイテリ株である。該株（ラクトバチルス・ロイテリR2LC/DSM20016およびラクトコッカス・ラクティス）は、6人の対象体の前腕における肌の生物相の系統発生解析を行った場合、ヒトの肌では見られなかった（参考文献13）。

【0067】

プラスミド、発現系、細菌、およびキットに加えて、本発明のさらなる製品として、細菌を含む医薬組成物および医療器具が挙げられる。このような組成物及び器具としては、特に、創傷被覆材、梱包材、綿棒、インプラントなど、すなわち、実際には、例えば管路、カテーテル、またはインプラントなどの、実際に創傷部位（例えば、外科的創傷部位）に導入されるかまたはそこに存在していてもよい全体的または部分的留置型医療器具が挙げられる。また、例えば、飲食もしくは摂取などのために経口投与するため、または、手

10

20

30

40

50

術中などに、創傷に局所投与するもしくは創傷に直接投与するため、または、直腸内、膣内などに投与するためなど、対象体に投与するための細菌を含む製品である、プロバイオティクス製品も挙げられる。

【0068】

したがって、本発明に係る製品（例えば、プラスミド、細菌株、プロバイオティクス、創傷被覆材など）は、医学療法において、特に、ヒトまたは動物の対象体の創傷治癒の促進において、有用である。本明細書で用いられる「創傷治癒の促進」なる語は、創傷の閉鎖、治癒または修復を、増強、改善、増大または誘導することを意味する。本発明の好適な態様において、ヒトまたは動物の対象体は、末梢血灌流の低下（末梢動脈疾患）、高血糖症、または神経障害などの、創傷治癒を損なわせる基礎的疾患のために創傷治癒を必要としているか、あるいは、対象体は、例えば、基礎的疾患（後天的であろうと遺伝的であろうと）や、医療の影響など、何らかの原因による免疫不全であってもよい。特に、対象体は、糖尿病に罹患していてもよい。

10

【0069】

治癒されるべき創傷としては、対象体の身体部位の損傷、外傷、または障害を挙げることができる。本方法によって治療することができる創傷の例としては、熱傷（高温または低温）、化学的火傷、放射線火傷、電気熱火傷、紫外線照射に過剰に曝されたことによる火傷（例えば、日焼け）、出産や分娩の結果としての会陰などの体組織の障害、会陰切開などの医療行為による損傷、切り傷、切開、擦過傷などを含む外傷誘導性損傷、事故による損傷、および術後損傷などの急性症状または急性創傷、ならびに、床ずれ（pressure sores）、褥瘡、潰瘍、糖尿病および血行不良に関する症状、および全ての種類の挫創などの慢性症状が挙げられる。さらに、創傷としては、皮膚炎、歯科手術による創傷、歯周疾患、外傷性創傷、および腫瘍関連の創傷を挙げることができる。さらなる例としては、例えば、胃炎または炎症性腸疾患などで生じる胃腸の創傷が挙げられる。

20

【0070】

したがって、「創傷」なる語は、本明細書において広く用いられ、組織の完全性の欠損または組織の障害もしくは損傷を含む。よって、この語は、組織の障害、外傷、または損傷、あるいは、原因は問わない（例えば、事故による損傷または外傷や、手術または他の意図もしくは目的による損傷もしくは疾患による）傷を含む。外傷は、肉体的損傷または機械的損傷、あるいは病原体を含む外部薬品または生物剤もしくは化学剤による傷害を含み得る。組織障害は、低酸素症、虚血、または再灌流によっても引き起こされ得る。創傷は、あらゆる種類の火傷を含む。この創傷は、急性であってもよいし慢性であってもよい。慢性創傷は、治癒段階のうち、例えば炎症期で停止する創傷として、または、30日以上、40日以上、50日以上、または60日以上で治癒しない創傷として説明され得る。創傷は、身体の内表面、外部表面または組織の内部に存在してもよいし、それらの上に存在してもよい。

30

【0071】

ある特定の実施形態において、創傷は、身体の外表面または組織上に存在し、例えば、肌（すなわち、皮膚）の創傷、または粘膜の創傷、特に、外部粘膜組織または身体の外表面（例えば、目、耳、鼻など）の創傷である。別の実施形態において、創傷は、胃腸の創傷である。また別の実施形態において、創傷は、胃腸の創傷ではない（すなわち、胃腸の創傷以外の創傷である）。

40

【0072】

細菌は、経口投与または局所投与などの簡便な、または所望の方法で投与されてもよいし、あるいは、創傷部位への直接投与、例えば、細菌を含む医薬組成物、被覆材、または器具の直接的な注射、注入、塗布、または導入によって投与されてもよい。他の実施形態において、細菌は、口腔に投与されてもよいし、鼻腔内に投与されてもよいし、吸入によって投与されてもよいし、直腸内に投与されてもよいし、膣内に投与されてもよい。したがって、細菌は、身体の開口部へ、または開口部を介して、投与され得る。胃腸の創傷への投与の場合、細菌は、経口投与されてもよい。

50

【0073】

細菌は、当該技術分野において周知されている常用の手順に従い、当該技術分野において周知されている常用の手段を用いて、上記経路のいずれかによる投与のために、簡便な、または所望の方法で処方または調製されてもよい。したがって、医薬組成物、医療器具、被覆材などに加えて、本発明のプロバイオティクス製品を処方して、例えば機能性食品などの栄養補助食品または栄養食品として提供してもよいし、これらの食品に加えてもよい。

【0074】

経口投与形態としては、粉末剤、錠剤、カプセル剤、液剤などが挙げられる。局所投与の場合、製品は、固体の支持体または基材の有無を問わず、例えば懸濁液などの液体、スプレーもしくはエアロゾル（粉末または液体）、ゲル、クリーム、ローション、ペースト、軟膏、または膏薬として処方されてもよいし、例えば、包帯、硬膏、パッド、細片、綿棒、スポンジ、マットなどの形態で処方されてもよい。さらに、細菌は、インプラント（例えば、歯科用インプラント）、チューブ、管路、カテーテルなどの医療器具の表面に供されても（例えば、塗布されても）よい。

10

【0075】

細菌は、培養物（active culture）、成長中の培養などの簡便な、または所望の形態で提供されてもよいし、凍結乾燥した形態で提供されてもよい。

【0076】

本発明に係る細菌株は、局所投与用または経口投与用に処方されて、肌または粘膜の表面創傷を治療することができる。その結果、本発明は、さらに、本発明の細菌株を含むプロバイオティクス製品を提供する。該プロバイオティクス製品は、例えば、医薬組成物であり、好ましくは経口投与用の医薬組成物である。あるいは、プロバイオティクス製品は、局所投与用であって、例えば、本発明の細菌株を含むローションまたはローションを染みこませた創傷被覆材である。

20

【0077】

本発明の製品（すなわち、医薬組成物、器具、被覆材など）は、誘導物質（誘導性プロモーターを用いる場合）を含んでいてもよい。誘導物質は、製品の一部（例えば、被覆材に組み入れられているか、または含まれている）として、またはこれとは別に、例えば、上記定義されたキットまたは組み合わせ製品の一部として、提供されてもよい。

30

【0078】

細菌および誘導物質は、製品中（例えば、被覆材または器具）に共に処方される場合、細菌を誘導物質とは別にして、使用時に一緒にする（すなわち、接触させる）形態で提供されてもよい。例えば、細菌および誘導物質を、一緒にまとめられた（例えば、接触または混合されている）別々の区画に入れてもよいし、使用時に破壊、分断、または開放し得る障壁（barrier、例えば、膜または他の仕切り）によって分離しておいてもよい。

【0079】

あるいは、誘導物質を別に処方して（例えば、細菌を含むキット、または細菌を含む製品に）提供し、使用時に誘導物質および細菌（または細菌を含む製品）を一緒にしても（例えば、接触させても）よい。これは、対象体への投与前であってもよいし、投与中であってもよいし、投与後であってもよい。例えば、細菌を含む製品をまず投与し、次いで、誘導物質を細菌に添加または適用してもよい。別の実施形態において、細菌および誘導物質を、投与前、例えば投与直前に、または投与中に、予め混合してもよい。

40

【0080】

細菌を凍結乾燥した形態で提供する場合は、投与前、例えば使用前または使用中などに、細菌を再構成、すなわち再懸濁することが望ましいであろう。これは、創傷および用いる製品の形態に依存し得る。例えば、ある創傷の場合では、細菌を再構成／再懸濁して活性化させるのに十分な液体が存在し得る。しかしながら、別の実施形態においては、細菌の再構成（または、別の表現では、懸濁もしくは再懸濁）のための液体を提供することが望ましいであろう。これは、別の容器または入れ物（例えば、キットまたは組み合わせ製

50

品の一部として)に入れて提供されてもよいし、入れ物、容器、または器具の別々の区画に入れて提供されてもよい。液体は、誘導物質を含むか含有していてもよく、誘導物質がある場合は、別の容器、入れ物、または区画に入れて提供されてもよい。液体は、凍結乾燥された細菌を再構成または懸濁するのに適した液体であればよく、例えば、水、水溶液、緩衝液、または生育用媒体もしくは培地などが挙げられる。

【0081】

したがって、例えば、二区画システム(例えば、被覆材、器具、入れ物または容器(例えば、ボトル)における)では、一方の区画に凍結乾燥された細菌を入れ、もう一方の区画に液体を入れてもよい。液体は、場合によっては、誘導物質を含有していてもよい。使用時に、または使用前に、2つの区画を混合または接触させて、創傷に適用してもよい。より具体的な実施形態において、細菌は、液体の形態で創傷に投与され、次いで、別の被覆材が適用されてもよい。したがって、単純な一実施形態において、キットは、単に、凍結乾燥された細菌が入った第1の容器または入れ物および細菌を再構成するための液体が入った第2の容器または入れ物を含むものであってもよい。場合によっては、キットは、誘導物質を含んでいてもよく、これは、第2の容器に入っているか、あるいは別の第3の容器または入れ物に入っている。

10

【0082】

したがって、例えば、前記プロバイオティクス製品は、好ましくは、乳酸菌株において発現されるタンパク質の発現を活性化することができる活性化ペプチドを含む。活性化ペプチドは、好ましくは、ペプチドS p p I P(すなわち、配列番号19のアミノ酸配列、またはその配列との配列同一性が少なくとも80%である配列を有するペプチド)である。

20

【0083】

皮膚創傷の場合、創傷被覆材の一方の区画に凍結乾燥された細菌を入れ、もう一方の区画に活性化ペプチドを入れることができる。2つの区画は、創傷に適用されると、一緒にされ、細菌が活性化ペプチドと接触する。あるいは、細菌を、防水性の硬膏剤の接着側、すなわち被覆材のうち滲出液と接触する側の、ゲル様構造に含ませることができる。使用時に、活性化ペプチドを、手作業で細菌に適用し、硬膏剤または被覆材を創傷領域に適用する。

【0084】

30

生細菌は、例えば天然ゼラチンなどのヒドロコロイドに含有されていてもよい。架橋によって、ゼラチンフィルムなどのヒドロコロイドに細菌を組み入れ、可塑性を持たせて乾燥することができ、保存中、水和させるまで生存能を保持する。生細菌は、架橋静電紡糸ヒドロゲル繊維に封入されてもよい。この形態では、細菌を凍結乾燥する必要がない。

【0085】

消化管の創傷の場合、少なくとも2つの分かれた区画を含むように錠剤が設計され、一方の区画には凍結乾燥された細菌を入れ、もう一方の区画には液体および活性化ペプチドを入れる。摂取前に錠剤を圧搾し、2つの区画を分けている内部膜を破壊して、内容物を混合する。口(例えば、歯肉)の創傷の場合、本発明に係る細菌は、粘度の高いペーストに加えて投与することができる。

40

【0086】

具体的には、肌への局所投与のための製剤としては、薬学的に許容される担体に加えて投与される軟膏、クリーム、ゲル、およびペーストを挙げることができる。局所用製剤は、当業者に周知されている油性または水溶性の軟膏基剤を用いて調製することができる。例えば、これらの製剤は、植物油、動物油、および、より好ましくは、石油から得られる半固体の炭化水素を含み得る。使用される具体的な成分としては、白色軟膏、黄色軟膏、アセチルエステルワックス、オレイン酸、オリーブオイル、パラフィン、ペトロラタム、白色ワセリン、鯨蠟、でんぷんグリセリン剤、白蠟、黄蠟、ラノリン、脱水ラノリン、およびモノステアリン酸グリセリンが挙げられ得る。例えば、グリコールエーテルおよびその誘導体、ポリエチレングリコール、ステアリン酸ポリオキシシル40、およびポリソルベ

50

ートなどの、様々な水溶性軟膏基材が用いられ得る。

【0087】

創傷に活性物質を送達するための基材、固体の支持体、および/または創傷被覆材の中および/またはそれらの上に、細菌株を供することができる。固体の支持体または基材は、医療器具またはその一部であってもよい。本明細書で用いられる「基材」または「固体の支持体」および「創傷被覆材」なる語は、広く、保護、吸収、排液などのために、創傷用に調製され、創傷に適用される基材のことをいう。

【0088】

一実施形態において、本発明は、形質転換細菌株に付着させるか、または形質転換細菌株を含む、創傷治癒材 (wound healing material) または創傷被覆材を提供するものであり、すなわち、被覆材は、本発明の形質転換細菌を投与するための媒体である。あるいは、媒体は硬膏または包帯であってもよい。本発明は、多くの種類の市販の基材および/または裏材のうちいずれか1つを含んでいてもよく、創傷治癒材の選択は、治療される創傷の性質に依存する。最も一般的に用いられる創傷被覆材について、以下で簡単に説明する。

【0089】

透明フィルム被覆材は、例えば、ポリウレタン、ポリアミド、またはゼラチン(これらの合成フィルムは、水蒸気、酸素、およびその他の気体を透過することができるが、水および細菌は透過することができず、吸収性が低く、滲出液の少ない創傷に適している)、ヒドロコロイド(ポリウレタン発泡体に結合した親水性のコロイド粒子)、ヒドロゲル(少なくとも60%程度の水を含有する架橋ポリマーで、高い吸収性を有し、創傷床から有毒成分を排除して、創傷領域の湿度レベルおよび温度を維持する)、発泡体(例えば、ポリウレタン発泡体の改変によって生産される高分子発泡体被覆材などの親水性または疎水性発泡体被覆材であり、吸収性が良好で、水蒸気を透過する)、アルギン酸カルシウム(海藻コロイド群由来のアルギン酸カルシウムから得られる繊維の不織複合物であって、アルギン酸は、吸収能が非常に高い。アルギン酸と滲出液とのイオン交換によって、不溶性のアルギン酸カルシウムが可溶性のアルギン酸ナトリウムに変換され、創傷床に創傷治癒に理想的である湿潤で無傷の表面を設けるので、アルギン酸カルシウムは、自己分解性創傷清拭を促進する)、およびセロハン(可塑剤を含むセルロース)から形成される。創傷の形状およびサイズを求め、測定値に基づいて正確な部位に合わせて設計された創傷被覆材を創傷に適用する。創傷部位は、機械的強度、厚み、感受性などが様々であり得るので、その部位の機械的な必要性および/またはその他の必要性に具体的に対処するように、基材を成型することができる。例えば、指先など、高度に神経が分布している箇所の場合は、基材の厚みを最小限度に抑えてもよい。指、足首、膝、肘などのその他の創傷部位は、機械的な応力に曝されるため、複数層の基材を必要としてもよい。

【0090】

またさらなる態様において、本発明は、ヒトまたは動物の対象体において創傷を治癒する方法を提供し、この方法は、創傷治癒を必要とするヒトまたは動物の対象体に本発明に係る細菌株を投与することを含む。該細菌株は、好ましくは、上述した医薬組成物または創傷被覆材に含有される。このような方法において、ヒトまたは動物の対象体は、好ましくは、末梢血灌流の低下(末梢動脈疾患)、高血糖症、または神経障害などの、創傷治癒を損なわせる基礎的疾患のために創傷治癒を必要とする。

【0091】

下記実施例において得られ、含まれる結果は、本発明の利点を証明している。特に、本発明のタンパク質発現形質転換細菌を用いることによって、例えば、タンパク質を直接調製する場合(すなわち、タンパク質のみで、細菌は含まない)または細菌のみの場合(例えば、組み換えプラスミドを含有させないなど、タンパク質を発現するように改変されていない細菌)と比較して、創傷治癒が改善され得る。さらに、細菌を創傷に投与すると、形質転換細菌の培養で得られた上清を投与する場合と比較して、効果の改善が見られ得る。したがって、タンパク質を発現する乳酸菌宿主によって、タンパク質を創傷に送達する

ことが有利である。相乗効果が存在し得ると考えられる。換言すると、創傷治癒に対する細菌の効果とタンパク質の効果とに、相乗効果があり得る。したがって、ある実施形態において、対応する未形質転換細菌（すなわち、プラスミドを含有しない）の効果、およびタンパク質として供される（すなわち、インサイチュにおいて細菌から発現されない）場合のタンパク質の効果と比較して、創傷治癒に対する形質転換細菌の効果は、累積効果よりも大きいものであり得る。

【0092】

この点について、例えば創傷部位においてpHを低下させるという細菌の効果が、タンパク質の活性を増強、向上、または促進する助けとなり得ると考えられる。理論に拘束されることを望むものではないが、さらに、本発明に係る形質転換細菌の投与によって、創傷部位におけるマクロファージ活性を促進する有利な効果が得られ得ると考えられる。例えば、マクロファージの数が増加し得る。

10

【0093】

創傷治癒に対する形質転換細菌の効果は、即時的であってもなくてもよく、その効果が見られるまで時間がかかってもよい（創傷治癒の改善が観察されるまで、例えば1時間以上、2時間以上、3時間以上、4時間以上、5時間以上または6時間以上かかってもよく、またそれより長く、例えば8時間以上、10時間以上、12時間以上、15時間以上、18時間以上、20時間以上または24時間以上、かかってもよく、あるいは、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上または6日以上かかってもよく、またそれより長く、例えば8日以上、10日以上、12日以上、15日以上、18日以上、20日以上または24日以上、かかってもよい）。年配者の慢性創傷の場合、治療群と対照群との間で差が見られるようになるまで、時間がかかる場合があり、例えば、約12週間かかる場合がある。

20

【0094】

本発明の具体的なかつ重要な有用性は、慢性創傷、特に潰瘍の治療にあり、特に、糖尿病性足潰瘍の治療にある。

【0095】

糖尿病患者の慢性足潰瘍の罹患率は、約18%である。2013年において、欧州の人口は7億4250万人に達し、糖尿病患者は3270万人で、そのうち290～580万人が慢性足潰瘍に罹患している。標準的な手当が行われた際に、12週間以内に治癒するのが創傷の25%未満である場合、この種の潰瘍の平均罹患期間は、数ヶ月の範囲である。この症状の最終段階は、患部である足の切断である。今日では、慢性足潰瘍患者の治療は、初期治療、在宅治療、介護施設、親族、自己管理、および病院の創傷外来への通院などに分かれている。現在の治療は、負荷軽減、外科的創傷清拭を用いた死組織の除去、創傷被覆材の繰り返し交換、抗生物質の全身投与、および、特殊な場合として、生きたウジまたはコラゲナーゼを用いた治療に頼っており、スウェーデンの少数の施設では、高圧酸素療法を提供可能である。基礎的原因がより大きい動脈の閉塞も含む場合、静脈グラフトをバイパスすることによって、外科的にこれを矯正することができる。今日では、創傷は、2～3日毎に治療される。提案された形態または製剤のうちのいずれかの状態である提案された改変乳酸菌を用いた治療は、この実際の日常的な治療を乱すものではない。したがって、本発明の治療によってこのような創傷の治癒が改善されることは、かなりの経済的利益があるだけでなく、患者の個人的な利益でもある。

30

40

【0096】

インビボにおいて、細菌は活性化し、ある期間（例えば、約1時間）で、コードされたタンパク質を産生して創傷表面に送達する。その後、細菌は不活化して死んでもよい。緩慢な、または死んだ乳酸菌は、被覆材が通常通り交換されるまで、創傷環境/被覆材環境に危険性なく存在することができる。

【0097】

本発明の生物療法では、タンパク質薬物化合物と比較して、製造コストは著しく低くなる。これは、生物療法では、活性タンパク質を創傷で直接産生するからである。

50

【0098】

足の機能損失を伴う糖尿病性足潰瘍などの開放創傷は、患者にとって、かなりの不快感や身体障害の原因となり、著しい感染の危険性のために抗生物質を長期間使用し、最終的に切断にいたるなど、生活の質に著しい負の影響を与え得る。したがって、治癒が改善されることによって、患者の個人的な利益が非常に大きなものとなり、また、抗生物質の使用を抑制する（その結果、抗生物質抵抗性が抑制される）という利益もある。本発明に係るこのような慢性創傷を治療することによって、創傷における内因性の警報シグナルを増幅し得、停止した創傷または慢性創傷の治癒プロセスを促進し得、治癒時間を短縮し得る。

【0099】

さらに、本発明は、適応性および医療従事者による用いやすさに利点を有し得る。

【0100】

本発明に係る代表的な方法および好適な実施形態を、以下の限定されない実施例および図を参照してさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】図1は、一晚培養した後、開始OD (start OD) を0.285および0.51として再植菌し、10 ng/mlまたは50 ng/mlのプロモーター活性化ペプチド SppIP を添加した mL rCK1 ラクトコッカス・ラクティスの経時的な増殖 (A) および pH (B) を示す。

【図2】図2は、一晚培養した後、開始ODを0.5として再植菌したラクトバチルス・ロイテリ R2LC におけるインピトロでの pLAB112__Luc の発現を、バイオイメージングによって経時的に測定した結果を示す。時間0において基線図を得た。プロモーター活性化ペプチド SppIP (50 ng/ml) および基質 D-ルシフェリン (Luciferin, 150 µg/ml) を直後に添加した。5分後にプレートを撮影し、その後1400分まで30分毎に撮影した。全てのサンプルにおいて、用いた培地はMRSである。ペプチドはプロモーター活性化ペプチド SppIP である。各群は8個のサンプルからなる。

【図3】図3は、一晚培養した後、開始ODを0.5として再植菌し、1日経過した皮膚全層創傷に適用したラクトバチルス・ロイテリ R2LC における pLAB112__Luc の発現を示す。インピボにおける発現を、非侵襲的なバイオイメージングによって経時的に測定した。1日経過した皮膚全層創傷を有する5匹のマウスに麻酔を施して、時間0における基線図を得た。その後、プロモーター活性化ペプチド SppIP (50 ng/ml) で活性化された25 µLのラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc および基質 D-ルシフェリン (150 µg/ml) を創傷の中央に添加して、5分後にマウスを撮影し、その後270分まで15分毎に撮影した。

【図4】図4は、健常マウスにおける創傷治癒時間を示す。創傷表面の50%が治癒するまでの時間 (A)、75%が治癒するまでの時間 (B)、または完全に (100%) 治癒するまでの時間 (C) を示し、全ての群において n = 5 である。A、B、C は、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

【図5】図5は、健常マウスにおける経時的な創傷サイズ (A) および創傷露出 (B) を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。全ての群において n = 5 である。A は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d0 ~ d5 を解析した結果を示す。時間および処理によって変化が見られた。対照 (control) と比較すると、d1 および d2 において、R2LC__pLAB112__LrCK1.4 によって創傷サイズは減少した。B は、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、全ての日について解析した結果を示す。治癒プロセス全体において、R2LC__pLAB112__LrCK1.4 によって創傷露出は減少した。

【図6】図6は、創傷誘導前に大腿動脈結紮を行うことによって、虚血 (ischemia) を誘導した場合であり、全ての群において n = 4 である。麻酔を施したマウスについて、レー

10

20

30

40

50

ザースペックルコントラスト解析を用いて、経時的に、虚血肢（Ａ）およびそれに対応する反対側の健側肢（Ｂ）における皮膚血流を測定した結果を示す。データは、灌流ユニット（PFU）で表す。ＡおよびＢは、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d 0 ~ d 7 を解析した結果を示す。時間および処理による変化は観察されない。

【図 7】図 7 は、創傷を誘導した際に虚血を起こしたマウスにおける創傷治癒時間を示す。創傷表面の 50 % が治癒するまでの時間（Ａ）、75 % が治癒するまでの時間（Ｂ）、または完全に（100 %）治癒するまでの時間（Ｃ）を示し、全ての群において n = 4 である。Ａ、Ｂ、Ｃは、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

【図 8】図 8 は、創傷を誘導した際に、その箇所において局所虚血を起こしたマウスにおける創傷サイズおよび創傷露出を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。全ての群において n = 4 である。Ａは、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d 0 ~ d 7 を解析した結果を示す。時間および処理によって変化が見られた。対照と比較すると、d 1 および d 2 において、R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 . 4 によって創傷サイズは減少した。Ｂは、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、全ての日について解析した結果を示す。治癒プロセス全体において、R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 . 4 によって創傷露出は減少した。

【図 9】図 9 は、アロキサンー水和物を静脈内注射して糖尿病（diabetes）を誘導した後の体重（Ａ）および血糖（Ｂ）を示す。糖尿病の対照は n = 4 , 糖尿病 R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L u c は n = 5、糖尿病 R 2 L C __ p L A B __ L r C K 1 . 4 は n = 4 である。ＡおよびＢは、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d 0 ~ d 6 を解析した結果を示す。時間および処理による変化は観察されない。

【図 10】図 10 は、創傷を誘導した際に糖尿病に罹患しているマウスにおける創傷治癒時間を示す。創傷表面の 50 % が治癒するまでの時間（Ａ）、75 % が治癒するまでの時間（Ｂ）、または完全に（100 %）治癒するまでの時間（Ｃ）を示し、糖尿病の対照は n = 4 , 糖尿病 R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L u c は n = 5、糖尿病 R 2 L C __ p L A B __ L r C K 1 . 4 は n = 4 である。Ａ、Ｂ、およびＣは、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

【図 11】図 11 は、創傷を誘導した際に糖尿病に罹患しているマウスにおける経時的な創傷サイズおよび創傷露出を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。糖尿病の対照は n = 4 , 糖尿病 R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L u c は n = 5、糖尿病 R 2 L C __ p L A B __ L r C K 1 . 4 は n = 4 である。Ａは、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d 0 ~ d 6 を解析した結果を示す。時間によって変化が見られた。Ｂは、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、全ての日について解析した結果を示す。差はなかった（p = 0 . 08）。

【図 12】図 12 は、p S I P 4 1 1 プラスミドを示す。

【図 13】図 13 は、11 日間にわたり、非侵襲的なバイオイメージング（IVIS スペクトル）によって蛍光シグナルを検出することで、創傷縁部の真皮におけるプラスミド発現（40 μg DNA）を定量化した結果を示す（n = 10）。

【図 14】図 14 は、健常マウスにおける創傷治癒時間を示す。創傷表面の 50 % が治癒するまでの時間（Ａ）、75 % が治癒するまでの時間（Ｂ）、または完全に（100 %）治癒するまでの時間（Ｃ）を示す（p C T R は n = 8、p C X C L 1 2 は n = 9）。Ａ、Ｂ、およびＣは、スチューデントの対応のない両側 t 検定の結果を示す。

【図 15】図 15 は、健常マウスにおける経時的な創傷サイズ（Ａ）および創傷露出（Ｂ）を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した（p C T R は n = 8、p C X C L 1 2 は n = 9）。（Ａ）は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d 0 ~ d 7 を解析した結果を示す。時間によって変化が見られた。（Ｂ）は、スチューデントの対応のない両側 t 検定の結果を示す。治癒プロセス全体において、p C X C L 1 2 によって創傷露出は減少する傾向が見られた（p = 0 . 08）。

【図 16】図 16 は、ラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C の細菌濃度を、光学密度（OD）および ml あたりコロニー形成ユニット（CFU / ml）として表した測定結果を示す

。

【図17】図17は、異なる濃度のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1.4 で処理した健常マウスにおける経時的な創傷サイズ (A) および創傷露出 (B) を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。A は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d0 ~ d2 を解析した結果を示す。時間および処理によって変化が見られた。(A) は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を、(B) は、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す ($P < 0.05$)。処理しない創傷と比較すると、OD が 0.2、0.5、1.0、および 1.25 のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1.4 で処理することによって、創傷露出が減少した (対照は $n = 15$ 、OD 0.2 は $n = 4$ 、OD 0.5 は $n = 10$ 、OD 1.25 は $n = 5$)。

10

【図18】図18は、異なる濃度のネズミ CXCL12.1 で処理した健常マウスにおける創傷サイズ (A) および創傷露出 (B) を 1 日あたり 1 点、2 日間測定した結果を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。A は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d0 ~ d2 を解析した結果を示す。時間によって変化が見られた。B は、最初の 2 日間の創傷露出を示す。(対照は $n = 15$ 、0.2 μg CXCL12.1 は $n = 4$ 、0.6 μg CXCL12.1 は $n = 5$ 、1.0 μg CXCL12.1 は $n = 4$)

【図19】図19は、0.2 μg の組み換えタンパク質で処理した健常マウスにおける創傷サイズ (A) および創傷露出 (B) を毎日 1 時間 10 分毎に測定した結果を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。A は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較によって、d0 ~ d2 を解析した結果を示す。時間によって変化が見られた。B は、最初の 2 日間の創傷露出を示す。(未処理は $n = 15$ 、CXCL12.1 は $n = 6$ 、CXCL17 は $n = 9$ 、Ym1 は $n = 9$)

20

【図20】図20は、ヒトの肌の上皮のパンチ生検による創傷において再上皮化を測定した結果を示す。パネル A は、未処理、または LB__Luc もしくは LB__LrCK1 で処理した上皮創傷のある肌ディスクを培養し、24 時間後に測定した培地の pH を示す。パネル B は、培養開始後 14 日に、創傷縁部から、露出した真皮上に成長した新規形成上皮スリーブの長さを示す。* は有意差があることを示し、一元配置分散分析、ボンフェローニ選択カラム比較の結果を示す ($P < 0.05$)。

30

【図21】図21は、凍結乾燥状態から再生させた直後のラクトバチルス・ロイテリ R2LC における、インビトロでの pLAB112__Luc の発現を、インビトロにおいてバイオイメーキングによって経時的に測定した結果を示す。時間 0 において基線図を得た。その後、プロモーター活性化ペプチド SppIP (50 ng/ml) および基質 D-ルシフェリン (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を直後に添加した。5 分後にプレートを撮影し、その後 930 分まで 5 ~ 15 分毎に撮影した。全てのサンプルにおいて、用いた培地は MRS である。ペプチドはプロモーター活性化ペプチド SppIP である。各群は 4 個のサンプルからなる。

【図22】図22は、凍結乾燥状態から再生させた直後であって、1 日経過した皮膚全層創傷に適用したラクトバチルス・ロイテリ R2LC における、インビボでの pLAB112__Luc の発現を、インビボにおいてバイオイメーキングによって経時的に測定した結果を示す。1 日経過した皮膚全層創傷を別々に 2 つ有する 3 匹のマウスに麻酔を施して、時間 0 における基線図を得た。その後、プロモーター活性化ペプチド SppIP (50 ng/ml) で活性化された 25 μL のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc および基質 D-ルシフェリン (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を創傷の中央に添加して、5 分後にマウスを撮影し、その後 270 分まで 15 分毎に撮影した。

40

【図23】図23は、凍結乾燥し (freeze-dried)、再生し、誘導されたラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1.4 で処理した健常マウスにおける経時的な創傷サイズ (A) および創傷露出 (B) を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。(A) は、二元配置分散分析、ボンフェローニ全カ

50

ム比較によって、d 0 ~ d 2 を解析した結果を示す。時間および処理によって変化が見られた。(B)は、一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す($p < 0.05$)。細菌を凍結乾燥し、直接再生し、誘導して創傷に適用した際のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc と比較して、ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1.4 処理後では、創傷サイズの減少が観察された(R2LC__pLAB112__Luc は $n = 4$ 、R2LC__pLAB112__LrCK1.4 は $n = 5$)。

【図24】図24は、健常マウスにおける経時的な創傷サイズ(A)および創傷露出(B)を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。時間および処理によって変化が見られ、pH 7.35 で懸濁した場合と比較して、pH 6.35 において、CXCL12 1 によって創傷サイズが減少する傾向が見られる($p = 0.07$) (pH 7.35 は $n = 8$ 、pH 6.35 は $n = 5$ 、pH 5.35 は $n = 4$)。一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

10

【図25】図25は、健常マウスにおける経時的な創傷サイズ(A)および創傷露出(B)を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。時間による変化のみが観察され、2つの異なる細菌懸濁液間に差はなかった(R2LC__pLAB112__Luc は $n = 4$ 、R2LC__pLAB112__LrCK1 は $n = 5$)。スチューデントの対応のない両側 t 検定の結果を示す。

【図26】図26は、創傷誘導後2日目の創傷に隣接する肌切片の真皮(A)、上皮(B)、および毛包(C)におけるCXCL12 1 レベルの測定結果を示し、ここで、創傷は、OD 0.5、OD 0.1、およびOD 1.25 のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1 で処理されている。一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

20

【図27】図27は、対照創傷およびOD 0.5、OD 0.1、およびOD 1.25 のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1 で処理された創傷において、創傷誘導後2日目の創傷に隣接する肌の真皮(A)および上皮(B)におけるF4/80⁺マクロファージの密度の測定結果を示す(対照は $n = 15$ 、OD 0.5 は $n = 10$ 、OD 1.0 は $n = 4$ 、OD 1.25 は $n = 5$)。一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

【図28】図28は、健常マウスにおける創傷治癒時間を示す。創傷は、pLAB112 で形質転換したラクトコッカス・ラクティス(L.L__pLAB112__LrCK1)または対照ラクトコッカス・ラクティスで処理された。創傷表面の50%が治癒するまでの時間(A)、75%が治癒するまでの時間(B)、または完全に(100%)治癒するまでの時間(C)を示し、両方の群において $n = 5$ である。スチューデントの対応のない両側 t 検定の結果を示す。

30

【図29】図29は、健常マウスにおける経時的な創傷サイズ(A)および創傷露出(B)を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した。両方の群において $n = 5$ である。時間および処理によって変化が見られ、対照ラクトコッカス・ラクティスと比較して、d 1 ~ d 4 において、L.L__pLAB112__LrCK1 によって創傷サイズが減少している。スチューデントの対応のない両側 t 検定の結果を示す。

40

【図30】図30は、組み換えケモカインで1時間処理した健常マウスの創傷治癒時間を示す。創傷表面の50%が治癒するまでの時間(A)、75%が治癒するまでの時間(B)、または完全に(100%)治癒するまでの時間(C)を示す(対照は $n = 11$ 、mCXCL12 1 は $n = 6$ 、mCXCL17 は $n = 8$ 、mYm1 は $n = 9$)。一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

【図31】図31は、組み換えケモカインで1時間処理した健常マウスの創傷サイズ(A)および創傷露出(B)を示す。創傷サイズは、毎日、図に含まれるスケールで、画像から測定した(対照は $n = 11$ 、mCXCL12 1 は $n = 6$ 、mCXCL17 は $n = 8$ 、mYm1 は $n = 9$)。時間および処理によって変化が見られ、対照と比較して、CXCL12 1、CXCL17、およびYm1によって創傷サイズが減少している。一元配

50

置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

【図32】図32は、未処理（no treatments）または異なる処理を行った健常マウスにおいて、最初の24時間での創傷閉鎖を示す（未処理は $n = 15$ 、 $0.2 \mu\text{g CXCL12}$ は $n = 4$ 、 $0.6 \mu\text{g CXCL12}$ は $n = 5$ 、 $1.0 \mu\text{g CXCL12}$ は $n = 4$ 、 $0.2 \mu\text{g CXCL12}$ 1時間は $n = 6$ 、 $0.2 \mu\text{g CXCL17}$ 1時間は $n = 9$ 、 $0.2 \mu\text{g Ym1}$ 1時間は $n = 9$ 、 R2LC_pLAB112_Luc OD0.5は $n = 4$ 、 $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ OD0.2は $n = 4$ 、 $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ OD0.5は $n = 10$ 、 $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ OD1.0は $n = 4$ 、 $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ OD1.25は $n = 5$ 、凍結乾燥した R2LC_pLAB112_Luc は $n = 4$ 、凍結乾燥した $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ は $n = 5$ 、 R2LC_pLAB112_Luc の上清（supernatant）は $n = 4$ 、 $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ の上清は $n = 5$ 、pCTRは $n = 8$ 、pCXCL12は $n = 9$ ）。このデータセットでは、統計解析は行わなかった。

10

【図33】図33は、DSS誘導性疾患の活性の毎日の評価（A）および1～7日目の疾患の負担の合計（B）を示す。DSS誘導性大腸疾患の活性は、賦形剤（vehicle）で処理した対照群と比較して、ラクトバチルス・ロイテリ pLAB112_Luc および pLAB112_LrCK1.4 を用いて処理することによって同様に改善する（DSS + vehicleは $n = 5$ 、DSS + R2LC_pLAB112_Luc は $n = 6$ 、DSS + $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ は $n = 7$ ）。一元配置分散分析、ボンフェローニ全カラム比較の結果を示す。

20

【図34】図34は、DSS誘導性疾患の活性の毎日の評価（A）および1～8日目の疾患の負担の合計（B）を示す。疾患の活性は、以前の記載（参考文献16）の通り、関連のある臨床症状を測定することで評価した。矢印は処理の開始を示す。DSS誘導性大腸疾患の活性は、 pLAB112_Luc での処理と比較して、ラクトバチルス・ロイテリ pLAB112_LrCK1.4 を用いて処理することによって改善する（DSS + R2LC_pLAB112_Luc は $n = 6$ 、DSS + $\text{R2LC_pLAB112_LrCK1.4}$ は $n = 6$ ）。スチューデントの対応のない両側t検定の結果を示す。

【図35】図35は、健常マウスにおいて誘導された全層肌創傷（直径5 mm）の、未処理、および R2LC または R2LC_LrCK1 で処理したものの0時間および24時間後の代表的な画像を示す。画像は、麻酔を施したマウスに含まれるスケールで撮影した。

30

【実施例】

【0102】

材料および方法

遺伝子コンストラクト（gene construct）の設計および作製

プラスミドの骨格となる pLAB112 （ pSIP411 と同等；参考文献11および15；表I）を、ラース・アクセルソン（Lars Axelsson）教授（ノルウェー食品研究所）から供与いただいた。細菌ラクトコッカス・ラクティスMG1363を pLAB112 で形質転換し、24時間増殖させた。その後、プラスミドを精製し、DNA産物をゲル上で確認した。

40

【0103】

【表 1】

表 I : p S I P 4 1 1 / p L A B 1 1 2 の主な特徴

特徴	位置 (配列番号 20)
複製決定基 (レプリコン領域)	260~2010
e r m B (エリスロマイシン耐性マーカー)	2342~2840
P _{s p p} I P (誘導性プロモーター)	3139~3290
s p p K (ヒスチジンタンパク質キナーゼ)	3305~4647
s p p R (応答調節因子)	4653~5396
g u s A (β グルクロニダーゼ)	5853~7658
P _{o r f} X (誘導性プロモーター)	5689~5835
転写ターミネーター	129~155 ; 5428~5460 ; 5602~5624
マルチクローニングサイト	1~35 ; 5851~5856 ; 7662~7673

10

【 0 1 0 4 】

ネズミ C X C L 1 2 - 1 の配列は、スウェーデン農業科学大学 (S L U) のステファン・ルース (Stefan Roos) によって、DNA 2 . 0 (メンローパーク、カリフォルニア州、米国) を用いて、ラクトバチルス・ロイテリにおける翻訳に最適化された。最適化された配列 (配列番号 1) を、DNA 2 . 0 によって、プラスミドベクター p J 2 0 4 中で合成した。ヒト C X C L 1 2 - 1 、ネズミ C X C L 1 7、ヒト C X C L 1 7、ネズミ Y m 1、およびヒト Y m 1 の配列は、S L U のステファン・ルースによって、G e n S c r i p t (ビスカタウェイ、ニュージャージー州、米国) を用いて、ラクトバチルス・ロイテリにおける翻訳に最適化された。最適化された配列を、配列番号 4 (ヒト C X C L 1 2 - 1)、配列番号 7 (ネズミ C X C L 1 7)、配列番号 10 (ヒト C X C L 1 7)、配列番号 13 (ネズミ Y m 1)、および配列番号 16 (ヒト Y m 1) として示す。

20

【 0 1 0 5 】

p L A B 1 1 2 中 1 7 1 b p の挿入断片 (h C X C L 1 2 o p t) を検出するように、プライマーを設計した：

30

5 ' G C A G C C T T A A C A G T C G G C A C C T 3 ' (配列番号 2 2)、

5 ' A C G T G C A A C A A T C T G C A A A G C A C 3 ' (配列番号 2 3)。

【 0 1 0 6 】

挿入断片の末端も、分子加工を継続するために最適化され、それによって挿入断片が新規ベクター p L A B 1 1 2 に適合するようになった。最適化された m C X C L 1 2 o p t 配列を、プラスミド P J 2 0 4 に導入した。大腸菌 P K 4 0 1 を p J 2 0 4 で形質転換した。プラスミド (p L A B 1 1 2 および p J 2 0 4) を、N E B 2 緩衝液中、制限酵素 X h o I および N c o I を用いて切断した。その後、断片 m C X C L 1 2 o p t をゲル上で精製した。次に、m C X C L 1 2 o p t 挿入断片を T 4 D N A リガーゼを用いて p L A B 1 1 2 ベクターに連結し、コンストラクト m L r C K 1 を得た。p L A B 1 1 2 ベクター中の挿入断片コンストラクトを、P C R によって確認した。次に、コンストラクトを配列解析 (マクロゲン (MacroGen)) によって確認した。最後に、ラクトバチルス・ロイテリ株 R 2 L C および D S M 2 0 0 1 6 を m L r C K 1 で形質転換し、コンストラクト陽性の R 2 L C クローンを 2 つ (4 および 7) 回収し、これらのコロニー由来のプラスミド m L r C K 1 (m L r C K 1 . 4 および m L r C K 1 . 7 とする) を再び配列解析 (マクロゲン) によって確認した。

40

【 0 1 0 7 】

同様のプロトコールおよび手順に従い、類似の方法で、プラスミド h L r C K 1、m L r C K 2、h L r C K 2、m L r M P 1、および h L r M P 2 を作製した (下記表 I I を参照)。

50

【 0 1 0 8 】

【表 2】

表 I I : プラスミドの概要

プラスミド	説明
p L A B 1 1 2	p S I P 4 1 1 と同一 (参考文献 1 5 および配列番号 2 0)
m L r C K 1	最適化 m C X C L 1 2 - 1 α 挿入断片を含む p L A B 1 1 2
m L r C K 1.4	形質転換ラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C のクローン 4 由来の m L r C K 1
m L r C K 1.7	形質転換ラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C のクローン 7 由来の m L r C K 1
h L r C K 1	最適化 h C X C L 1 2 - 1 α 挿入断片を含む p L A B 1 1 2
m L r C K 2	最適化 m C X C L 1 7 挿入断片を含む p L A B 1 1 2
h L r C K 2	最適化 h C X C L 1 7 挿入断片を含む p L A B 1 1 2
h L r M P 1	最適化ヒト Y m 1 挿入断片を含む p L A B 1 1 2
m L r M P 2	最適化ネズミ Y m 1 挿入断片を含む p L A B 1 1 2
p L A B 1 1 2 _ _ L u c	ルシフェラーゼ挿入断片を含む p L A B 1 1 2

10

【 0 1 0 9 】

20

プラスミド発現のインビトロにおける解析

一晚培養後、再植菌し、OD 0.5 まで増殖させたラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C p L A B 1 1 2 _ _ L u c を、96 穴プレートに播種 (200 μ L / ウェル) するか、または凍結乾燥製剤からすぐに再懸濁した。非侵襲的なバイオイメージング (I V I S スペクトル、パーキン・エルマー (Perkin Elmer)) を用いて蛍光強度を求めた。時間 0 における基線図を得た。次に、活性化ペプチド S p p I P (50 ng / ml) および基質 D - ルシフェリン (150 μ g / ml) を直後に添加した。次いで、5 分後にプレートを撮影し、その後 1400 分まで 30 分毎に撮影した。データを Living Image 3.1 ソフトウェア (パーキン・エルマー) を用いて定量化し、イメージングパラメータを比較解析のために維持した。放射輝度は、プラスミドの発現に比例するものと見なした。

30

【 0 1 1 0 】

動物

実験は、ウプサラ地方実験動物倫理委員会の承認を得た。マウス C 5 7 B 1 / 6 (タコニック (Taconic)) およびバックグラウンドが C 5 7 B 1 / 6 であるマウス C X 3 C R 1 + / G F P (元はジャクソン・ラボラトリー (The Jackson Laboratory) 製) を用いた。実験を通して、動物は、水および食事に自由にアクセスした。

【 0 1 1 1 】

創傷誘導

マウスに麻酔を施し (1 ~ 3 % イソフルラン、200 ml / 分)、後肢の毛を、剃った後に除毛クリーム (ヴィート (Veet) (登録商標)) を 1 分間塗布し、水で流すことによって除去した。滅菌したパンチ生検針 (直径 5 mm) を用いて、全層 (上皮、真皮、および皮下組織) 創傷を誘導した。最初の 5 日間は毎日、局所的に鎮痛剤 (エムラ (Embla) クリーム) を塗布した。

40

【 0 1 1 2 】

局所的創傷治療

25 μ L の生理食塩水、ラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C p L A B 1 1 2 _ _ L u c 、または R 2 L C p L A B 1 1 2 _ _ L r C K 1 のいずれかを用いて、毎日、創傷を処理した。細菌を一晚培養後、再植菌し、OD 0.5 まで増殖させ、適用 5 分前に活性化ペプチド S p p I P (50 ng / ml) で前もって活性化し、創傷表面の中央に局所的に添加した。投与実験の場合、2 日間毎日、25 μ L の生理食塩水、または、一晚培養後に再植

50

菌し、OD 0.5 まで増殖させ、適用 5 分前に活性化ペプチド S p p I P (5 0 n g / m l) で前もって活性化し、創傷表面の中央に OD 0.2、OD 0.5、OD 1.0、または OD 1.25 の濃度で局所的に添加したラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 で、創傷を処理した。各タンパク質を用いた比較実験の場合、10 μ L の生理食塩水、ネズミ C X C L 1 2、C X C L 1 7、または Y m 1 (6 0 μ L の生理食塩水中、合計 2 0 0 n g のタンパク質を 1 0 分間隔で 1 時間与えた) のいずれかを用いて、毎日、創傷を処理した。C X C L 1 2 の用量漸増実験の場合、2 0 0 n g、6 0 0 n g、または 1 μ g を、1 日当たり 1 回 1 時点、1 0 μ L の生理食塩水中で創傷に添加した。

【 0 1 1 3 】

プラスミド発現のインビボにおける解析

10

ラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C p L A B 1 1 2 __ L u c を一晩培養後、再植菌し、OD 0.5 まで増殖させた。非侵襲的なバイオイメーキング (I V I S スペクトル、パーキン・エルマー) を用いて蛍光強度を求めた。時間 0 における基線図を得た。次に、2 5 μ L のラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C p L A B 1 1 2 __ L u c を創傷の中央に添加した。細菌は、適用 5 分前に活性化ペプチド S p p I P (5 0 n g / m l) および D - ルシフェリン (1 5 0 μ g / m l) で前もって活性化した。2 7 0 分まで 1 5 分毎に、マウスを撮影した。データを L i v i n g I m a g e 3 . 1 ソフトウェア (パーキン・エルマー) を用いて定量化し、イメージングパラメータを比較解析のために維持した。放射輝度は、プラスミドの発現に比例するものと見なした。

【 0 1 1 4 】

20

創傷サイズおよび外見の観察

標準的な写真 (conventional photos) を取得することで、麻酔を施したマウス (1 ~ 3 % イソフルラン、2 0 0 m l / 分) において、創傷のサイズおよび外見を毎日観察した。スケールは、取得した画像に含まれ、I m a g e J (N I H 製のフリーソフト) を用いて創傷サイズを解析した。サイズが 0 . 5 m m ² 未満になったら、創傷が治癒したものと見なした。

【 0 1 1 5 】

皮膚血流の観察

麻酔を施したマウス (1 ~ 3 % イソフルラン、2 0 0 m l / 分) において、非侵襲的なレーザースペックルコントラスト解析を用いて、治癒中の創傷を有する後肢全体の血流を測定し、P I M S o f t 3 (ペリメド (Perimed)) を用いてデータを解析した。肢 (フレーム 1 . 4 x 1 . 4 c m) を、1 秒当たり 1 0 画像ずつ 2 分間撮影し、2 0 枚ごとに平均した。データは灌流ユニット (P F U) で表す。

30

【 0 1 1 6 】

灌流の低下

マウスに麻酔を施し (1 ~ 3 % イソフルラン、2 0 0 m l / 分)、表在性腹壁動脈枝より上流の大腿動脈を結紮および切除することによって、後肢の虚血を誘導した。

【 0 1 1 7 】

高血糖症の誘導

滅菌した生理食塩水に素早く溶解させたアロキサナー水和物 (8 m g / m l、1 μ L / g 体重) の 1 回用量を、尾静脈内に注射した。実験を通して、毎日、血糖および体重を測定した。血糖が 1 6 . 7 m m o l / l よりも高いものを、高血糖症と定義した。

40

【 0 1 1 8 】

統計解析

データは、平均 \pm S E M で表す。ボンフェローニ全カラム比較ポストホックテストと共に二元配置分散分析 (Two-Way ANOVA with Bonferroni compare all columns post hoc test) を用いて、治癒プロセスを経時的に解析した。ボンフェローニ全カラム比較ポストホックテストと共に一元配置分散分析 (One-Way ANOVA with Bonferroni compare all columns post hoc test) を用いて、n > 2 である群の一時点における治癒プロセスを解析し、スチューデントの対応のない両側 t 検定 (Students two-tailed unpaired t-test)

50

を用いて、 $n = 2$ である場合の一時点における治癒プロセスを解析した。 $p < 0.05$ を、統計的に有意であると見なした。

【0119】

実施例1：プラスミドLrCK1で形質転換した細菌の増殖

一晚培養後、再植菌し、OD0.3またはOD0.5まで増殖させた、mLrCK1を含有するラクトコッカス・ラクティスは、10ng/mLまたは50ng/mLで活性化ペプチドSppIP（配列番号19）を添加した場合、増殖の低下は見られなかった。Mes培地で増殖させた場合、この増殖実験中にpHを測定すると、その低下は増殖期に最も強く表れ、その後pH6.7付近で安定した（図1）。（肌のpHは5.5、創傷のpHは7.15～8.9であり、塩基性pHは治癒速度の低下と相関する（参考文献14））

10

【0120】

実施例2：プラスミドpLAB112__Lucの発現

一晚培養後、再植菌し、2時間増殖させたラクトバチルス・ロイテリR2LCにおけるプラスミドpLAB112__Lucのインビトロにおける発現は、600分（10時間）よりも長く維持された。活性化ペプチドSppIPで活性化しなかったプラスミドでは、漏出/発現は見られなかった（図2）。

【0121】

一晚培養後、再植菌し、2時間増殖させた、pLAB112__Lucを含有するラクトバチルス・ロイテリR2LCを、麻酔を施したマウスの1日経過した皮膚全層創傷に載置した場合、細菌は、創傷部位に限定され、最初の1時間はプラスミドの発現が高かったが、4時間より長くシグナルが検出された（図3）。

20

【0122】

実施例3：健常マウスにおける創傷治癒の改善

治癒プロセス中、創傷を毎日観察した。健常マウスにおいて、毎日1回、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4を適用すると、創傷に何も適用しなかった対照マウスおよび対照ラクトバチルス・ロイテリR2LC（pLAB112__Luc）を毎日適用したマウスと比較して、創傷表面が75%閉鎖するまでの時間と創傷が完全に（100%）閉鎖するまでの時間との両方が短縮された（図4）。創傷治癒に対するラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4の効果は、創傷誘導後1日目の間が最も顕著であった。創傷に何も適用しなかった対照マウスと比較すると、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4を毎日適用することによって（創傷誘導後1日および2日）、創傷サイズはさらに減少した。創傷に何も適用しなかった対照マウスと比較すると、この群において、曲線下面積として測定した創傷露出の合計もまた、減少していた（図5）。図35は、健常マウスにおいて誘導された全層肌創傷（直径5mm）の、未処理、およびR2LC__LucまたはR2LC__mLrCK1で処理したものの0時間および24時間後の代表的な画像を示す。

30

【0123】

実施例4：組織灌流が正常でない健常マウスにおける創傷治癒の改善

創傷が誘導された肢の大腿動脈の結紮によって、創傷を誘導した日に、皮膚灌流は50%減少した（図6および表III）。虚血を起こしたマウスにおいて、毎日1回、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4を適用すると、創傷に何も適用しなかった対照マウスおよび対照ラクトバチルス・ロイテリR2LC（pLAB112__Luc）を毎日適用したマウスと比較して、創傷表面が50%閉鎖するまでの時間と75%閉鎖するまでの時間との両方が短縮された（図7）。また、皮膚灌流を減少させたマウスにおいても、創傷治癒に対するラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4の効果は、創傷誘導後1日目の間が最も顕著であり、創傷に何も適用しなかった対照マウスと比較すると、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4を、創傷誘導後1日および2日目に毎日適用することによって、創傷サイズはさらに減少した。創傷に何も適用しなかった対照マウスと比較すると

40

50

、この群において、創傷露出の合計もまた、減少していた（図8）。

【0124】

【表3】

表III：麻酔を施したマウスにおいてレーザースペckルコントラスト解析によって測定された基礎的皮膚灌流。データは、灌流ユニット（PFU）を用いて平均±SEMで表し、全ての群においてn=4である。

	健常	虚血	減少 (%)
対照	62.5±4.3	34.0±1.8	46
R2LC__pLAB112__Luc	57.3±2.7	31.3±1.1	46
R2LC__pLAB112__LrCK1.4	65.0±7.2	30.8±0.4	52

10

【0125】

実施例5：高血糖症マウスに於ける創傷治癒の改善

アロキサンをを用いてマウスを糖尿病にすると、その後、創傷治癒プロセス中は高血糖（ $>16.7\text{ mmol/L}$ ）のままであり、体重は減少しなかった（図9）。糖尿病に罹患しているマウスにおいて、毎日1回、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4を適用すると、創傷に何も適用しなかった対照マウスおよび対照ラクトバチルス・ロイテリR2LC（pLAB112__Luc）を毎日適用したマウスと比較して、創傷表面が75%閉鎖するまでの時間が短縮された（図10）。Lucを含むラクトバチルス・ロイテリR2LCを毎日適用すること、および創傷に何も適用しなかった対照マウスと比較すると、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__pLAB112__mLrCK1.4を毎日適用することによって、糖尿病マウスにおける創傷露出は減少する傾向が見られた（ $p=0.08$ ）（図11）。

20

【0126】

実施例6：CXCL12をコードするプラスミドでトランスフェクションされた創傷縁部の真皮におけるCXCL12の真皮過剰発現

pVAX1骨格にCMVプロモーター（配列番号24）（V260-20、インビトロジェン（Invitrogen）、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）を含むプラスミドを構築し、pCTRと呼ばれる-copGFP-T2A-Luc2-（配列番号25）またはpCXCL12と呼ばれる-CXCL12-P2A-copGFP-T2A-Luc2-（配列番号26）のいずれかの挿入断片を、以前の記載（参考文献18）の通り導入した。ネズミIgG分泌配列を、CXCL12のための分泌配列と置換した。したがって、pCTRプラスミドは、GFP（緑色蛍光タンパク質）およびルシフェラーゼをコードするが、ケモカインはコードしない。プラスミド（全体積100μLの生理食塩水中に40μg）を、創傷縁部の4箇所の真皮に注入した。麻酔10分前に、D-ルシフェリン（150mg/kg、#122796、パーキン・エルマー、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）を腹腔内注射し、バイオイメーjing装置（IVISスペクトル、パーキン・エルマー）を用いて画像を取得した後、ルシフェラーゼ活性に基づいて、導入遺伝子の発現を経時的に測定した。データをLivingImage3.1ソフトウェア（パーキン・エルマー）を用いて定量化し、イメージングパラメータを比較解析のために維持した。設定も維持して、反対側の参照領域を減じた対象領域を選択した。放射輝度は、プラスミドの発現に比例するものと見なした。

30

40

【0127】

創傷縁部の真皮におけるプラスミドの発現は、非侵襲的なバイオイメーjingを用いて測定され、CXCL12の発現に相当する、プラスミドにコードされているルシフェラーゼ酵素による光と相関していた。発現は2日目に最大となり、その後、創傷が閉鎖し、真皮が再構成されるにつれて減少した（図13）。CXCL12の過剰発現は、創傷が完全

50

に治癒するのを加速はしなかったが、p C T Rと比較すると、創傷表面が75%閉鎖するまでの時間を短縮した(図14)。p C T Rと比較すると、創傷誘導および真皮トランスフェクション後4~6日目において、創傷表面は、p C X C L 1 2の真皮発現によって減少していた(図15)。この結果は、本システムを用いて創傷に送達されたC X C L 1 2によると、最初の24時間は劇的な効果はなく、むしろ、それより後の時点において小さな効果があるということを証明している。

【0128】

実施例7：L u cおよびL r C K 1を用いた局所治療の用量応答ラクトバチルス・ロイテリ

一晚培養後、ラクトバチルスを再植菌し、OD0.5まで増殖させ、M R S中において希釈または濃縮し、OD0.2、OD0.5、OD1.0、およびOD1.25とした。異なる4つの濃度を、 10^{-9} に希釈し、各サンプルの10 μ Lをエリスロマイシンを含有するM R S寒天に播種し、嫌気槽において、37℃、二酸化炭素濃度5%で一晚培養した。プレート上のコロニーをカウントし、濃度をmLあたりコロニー形成ユニット(CFU/mL)で表した。

【0129】

投与実験の場合、2日間毎日、25 μ Lの生理食塩水、または、一晚培養後に再植菌し、OD0.5まで増殖させ、適用5分前に活性化ペプチドS p p I P (50ng/mL)で前もって活性化し、創傷表面の中央にOD0.2、OD0.5、OD1.0、またはOD1.25の濃度で局所的に添加したラクトバチルス・ロイテリR 2 L C _ p L A B 1 1 2 _ L r C K 1.4で、創傷を処理した。OD0.5のもの25 μ Lには、 5×10^7 の細菌(2×10^9 cfu/mL)が存在し、これは、投与期間として1000回分を意味する。

【0130】

細菌濃度を光学密度によって測定し、mLあたりコロニー形成ユニットを図16に示す。先の投与と同様に培養し活性化したR 2 L C _ p L A B 1 1 2 _ L r C K 1.4の用量が最小の場合(OD0.2は 2×10^7 の細菌に相当)に、24時間後の創傷サイズが最小となり、異なる4つの濃度の全てにおいて、創傷誘導後24時間および48時間に創傷の閉鎖が著しく加速されており(図17A)、したがって、未処理の創傷と比較すると、最初の48時間で創傷露出が減少していた(図17B)。この結果は、最大の効果を与える最小用量よりも 10^3 高い(OD1.25は 1×10^{10} の細菌に相当)用量の投与によっても、未処理の創傷と比較すると、最初の48時間は、最大の創傷閉鎖をもたらす用量と同程度まで、創傷治癒が著しく加速されることを示している。最大用量を与えた創傷において、炎症の誘導、または他の負の副作用の兆候は観察されなかった。データは、低用量のラクトバチルス・ロイテリR 2 L C _ L r C K 1であっても、創傷治癒が加速されることを示している。

【0131】

実施例8：局所治療としてのm C X C L 1 2 1 タンパク質の用量漸増

創傷表面に投与されるm C X C L 1 2 1 の用量の影響を調べるために、10 μ Lの生理食塩水中、0.2 μ g、0.6 μ g、または1 μ gのm C X C L 1 2 1 (R n D システム(RnD Systems))を、2日間毎日創傷に送達した。投与は1日あたり1回とした。

【0132】

未処理と比較すると、1日あたり1回、m C X C L 1 2 1 を毎日送達することでは、最初の2日間で創傷治癒は加速されなかった(図18A、18B)。毎日1時間、10分間隔で与えられた合計0.2 μ gのm C X C L 1 2 1 によって、最初の48時間に治癒が加速された(図18および19)ので、創傷治癒を加速するのはC X C L 1 2 1 の連続的な送達であるということを、このデータは示している。

【0133】

実施例9：ヒトの肌生検における再上皮化

滅菌した正常なヒトの肌を、ウプサラ大学病院にて定期的に乳房縮小術を受けている健康白人女性から、提供の同意を得て入手した。サンプルを、2%仔ウシ血清 (Hyclone (登録商標)、ハイクローン・ラボラトリー (HyClone Laboratories)、ローガン、米国) を添加した生理学的 D MEM で覆い、滅菌条件下で実験室まで輸送した。

【0134】

以前の記載の通り (参考文献 17)、皮下組織を除去し、残った真皮および上皮を 6 mm の肌生検パンチ (インテグラ・ミルテックス (Integra Miltex)、ヨーク、ペンシルベニア州、米国) および滅菌したハサミを用いて切り出した。直径 6 mm の肌ディスクの中心において、3 mm の肌生検パンチおよび滅菌したハサミを用いて、上皮を除去した。次に、サンプルを 1 つずつ、上皮を上にして、滅菌した 24 穴プレートに入れた。培地 (D MEM) は全て、BSA、2% または 10% の抗生物質 (10 µg/mL のエリスロマイシン、シグマ・アルドリッチ (Sigma Aldrich)、ブーフス、スイス) を添加した。真皮側の栄養素を維持するために、すなわち、肌の真皮側において栄養素の濃度が最高になるように、各ウェルに 0.5 mL の培地を添加し、培地を毎日交換した。培地の交換と同時に、浮遊している肌ディスクの上皮創傷の中央に、10 µL の MRS 中、 10^6 のラクトバチルス・ロイテリ R2LC__Luc またはラクトバチルス・ロイテリ R2LC__LrCK1 を載置した。細菌を再植菌し、MRS 中で 2~4 時間、対数期となるように増殖させた。サンプルは、37℃、二酸化炭素濃度 5%、湿度 95% で、14 日間インキュベートした。

【0135】

検体を、中央を通るように切り、半分を 4%ホルムアミド、pH 7.38 で一晩固定し、エタノール-キシレン系列で脱水して、最終的にパラフィンに包埋した。検体の中心部分から始まる切片 (10 µm) をスライドガラスに載せ、脱パラフィン、再脱水を行い、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。Leica DFC420 C カメラおよび Plan Fluot 40x0.7 NA 対物レンズを備えた Leica Leits Dmr b を用いて、画像を撮影した。再上皮化または上皮スリーブの長さを、ImageJ (NIH) を用いて画像内で測定した。

【0136】

培養中の肌ディスクにラクトバチルスを追加すると、24 時間後の測定では、培地の pH は低下していた (図 20A)。培養開始 14 日後において、肌ディスクに誘導された創傷の縁部の上皮は、培地中に 10% FCS が存在すると、増殖して露出していた真皮を覆い、2% FCS を添加した培地で肌ディスクを培養した場合は、ほとんど増殖しなかった (図 20B)。R2LC pLAB112 Luc または R2LC pLAB112__LrCK1 で処理された肌ディスクでは、有害な影響は巨視的には検出されず、R2LC pLAB112__LrCK1 で 14 日間、肌ディスクを処理した場合は、創傷において再上皮化の拡大が測定された (図 20B)。

【0137】

実施例 10: 凍結乾燥および再生後の細菌の機能性

凍結乾燥用の異なるプロトコールおよび 35 種の異なる製剤を試験し、最長 2 ヶ月まで、生存能を測定した。また、より大きいパッチの凍結乾燥したラクトバチルス・ロイテリを、大規模工業生産と同一の設定で、適正製造基準に従って作製した。-20~40℃ にわたる温度で最長 2 ヶ月保存した後の生存能について、このパッチ由来の凍結乾燥サンプルを解析した。SppIP (50 ng/mL) を含有する等量の水または MRS 培地を添加することで、凍結乾燥した細菌を再生し、すぐに、96 穴プレートへの播種または上述した 1 日経過後の創傷への直接適用を行うことによって、インビトロまたはインビボにおける発現を解析した。

【0138】

最も見込みのある製剤によると、凍結乾燥直後から、+4℃ で保存されたサンプルを測定した 2 ヶ月目の解析まで、生存能は安定していた。この生存能は、現在栄養補助食品として売られている凍結乾燥した細菌で許容される範囲に、十分収まっていた。凍結乾燥し

たラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc のプラスミドの発現を蘇生直後に測定することによって、発現が即時誘導され、450 分で最大となり、その後減少していくことが示された (図 21)。24 時間 (1440 分) 後には、発現は見られず、生細菌もいなかった。凍結乾燥したラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc を再生後、50 ng/mL (SppIP) で誘導し、すぐにマウスの皮膚創傷に載置すると (25 μ L あたり 5×10^7)、増殖期にある新鮮な細菌を溶液に添加した場合 (図 3) に見られるのと同様の様式で、発現は直接増加し、約 1 時間高くなった (図 22)。

【0139】

創傷治癒に対する効果を試験するために、凍結乾燥した細菌 (25 μ L あたり 5×10^7) を再び再生後、誘導し、すぐにマウスの皮膚創傷に載置した。創傷を、2 日間毎日観察すると、本プロトコールであっても、ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1 で処理した創傷は、ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc で処理した創傷と比較すると、治癒の加速を示した (図 23)。このデータは、十分な CXCL12 を産生し送達することによって、インビボにおいて創傷治癒を加速するために、ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112 を対数増殖期まで予め培養しておく必要はないということを示している。

【0140】

実施例 11：ケモカインシグナル伝達の pH 依存効果

ケモカインは、単量体、二量体、または、それ自体で形成されるか、もしくは他のケモカインと相互作用することで形成される多量体として生じ得る (参考文献 22)。異なる組み合わせおよび異なる構造は、異なる受容体シグナル伝達を誘導し、それによって、異なる細胞応答が誘導される (参考文献 34)。これは、新規の、まだ調査されていない分野であり、可能性のある組み合わせは、局所的な組織の微環境に依存する。また、局所 pH は、局所的なマクロファージの機能に影響を及ぼす (参考文献 23)。

【0141】

ケモカインの効能のうち、pH 依存効果を調べるために、pH が 7.35、6.35、または 5.35 である 10 μ L の生理食塩水中、0.2 μ g の CXCL12 1 を、2 日間毎日、創傷に適用した。

【0142】

ケモカインを含有する緩衝液の pH を変化させることは、処理された創傷の治癒様式に影響を及ぼし、CXCL12 を pH 7.35 の生理食塩水に懸濁した場合と比較して、CXCL12 を pH 6.35 の生理食塩水に懸濁した場合は、創傷誘導後 1 日で創傷サイズが減少する傾向が見られた ($p = 0.07$) (図 24)。このデータは、創傷治癒の加速を誘導する態様において、pH が 6.35 であるということが、創傷表面に適用される組み換え CXCL12 の効果を高めるということを示している。

【0143】

実施例 12：効果を発揮するための、細菌による創傷表面への現場 (on site) ケモカイン送達の重要性

新鮮な上清で創傷を処理するために、ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc および R2LC__pLAB112__LrCK1 を 10 mL の MRS に 37 で再植菌し、OD 0.5 まで増殖させ、遠心分離 (> 2000 rpm、5 分)、1 mL の MRS に再懸濁し、活性化して (SppIP、50 ng/mL)、4 時間増殖させた。その後、サンプルを遠心分離 (> 2000 rpm、5 分)、上清を保存した。次に、この上清 25 μ L を、2 日間毎日 1 回、創傷に適用した。

【0144】

ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__LrCK1 による、創傷表面への CXCL12 1 の細菌直接送達の重要性が、誘導後のラクトバチルス・ロイテリ由来の新鮮な上清を創傷に添加した後、2 日間毎日、創傷誘導を行ったモデルにおいて証明された。ラクトバチルス・ロイテリ R2LC__pLAB112__Luc または R2LC__

10

20

30

40

50

p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 由来の新鮮な上清で処理を行った場合の創傷サイズまたは合計創傷露出に差は見られなかった ($p = 0.2595$) (図 2 5)。

【 0 1 4 5 】

実施例 1 3 : ラクトバチルスが送達する C X C L 1 2 によって創傷周囲の肌における C X C L 1 2 レベルが上昇する

定量的解析のために、創傷周囲の肌 (創傷から $0 \sim 100 \mu\text{m}$) を実験最終日に取り出し、液体窒素で素早く凍結し、切片 ($10 \mu\text{m}$) を作製した。氷冷メタノールで固定し (10 分)、 0.5% T r i t o n - X で透過化処理を行った (15 分) 後、C X C L 1 2 1 を標的とする抗体 (ポリクローナル抗体、アブカム (Abcam)) およびマクロファージ抗体 F 4 / 8 0 (クローン B M 8、e バイオサイエンス (eBioscience)) とともに組織をインキュベートし、洗浄後、A l e x a F l u o r 4 8 8 および N o r d i c L i g h t s 5 5 7 (インビトロジェン) を結合した対応する二次抗体とインキュベートした。最終的に、組織を洗浄してスライドガラスに載せ (F l u o r o m o u n t、# 0 1 0 0 - 1 0、サザンバイオテック (Southern Biotech)、バーミンガム、アラバマ州、米国)、回線走査共焦点顕微鏡 (line-scanning confocal microscope、光学 0.5 倍ズームの piezo-motor 制御 W P l a n A p o $40\times/1.0$ を備えた Z e i s s L S M 5 L i v e、ツァイス (Z e i s s)、オベルコーヘン、ドイツ) を用いて画像化した。タンパク質レベルおよびマクロファージを、I m a g e J (N I H) および I M A R I S ソフトウェア 8.2 (ビットプレーン (Bitplane)、チューリッヒ、スイス) を用いて画像内で定量化した。比較を可能にするために、画像取得中は顕微鏡の設定を維持した。C X C L 1 2 1 の測定値は、平均蛍光強度 (M F I) で表す。

【 0 1 4 6 】

未処理の創傷に隣接する肌と比較すると、異なる用量のラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 で、2 日間毎日 1 回、創傷を処理すると、創傷に隣接する肌における C X C L 1 2 1 の肌組織でのレベルが上昇したが (図 2 6)、これは、真皮、上皮、および毛包のどれにもあてはまった。

【 0 1 4 7 】

実施例 1 4 : ラクトバチルスが送達する C X C L 1 2 によって創傷周囲の肌におけるマクロファージレベルが上昇する

未処理の創傷に隣接する真皮と比較すると、O D 0.2 および O D 0.5 のラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 を創傷に適用した場合、異なる用量のラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 で、2 日間毎日 1 回、創傷を処理すると、創傷誘導後 2 日目の創傷に隣接する真皮における F 4 / 8 0 + マクロファージの密度が上昇した (図 2 7 A)。未処理の創傷に隣接する上皮と比較すると、ラクトバチルス・ロイテリ R 2 L C __ p L A B 1 1 2 __ L r C K 1 を O D 1.25 で創傷表皮に与えた場合、創傷誘導後 2 日目の創傷に隣接する上皮において、F 4 / 8 0 + マクロファージが増加した (図 2 7 B)。

【 0 1 4 8 】

実施例 1 5 : ラクトコッカス・ラクティスを用いた創傷治癒の加速に対する効果の確認
細菌が産生する特定のケモカインの局所的かつ連続的な送達は、細菌株にかかわらずこの機構に重要であるということを示すために、別の株を用いてケモカインを産生し、創傷表面に直接送達した。ラクトコッカス・ラクティスを p L A B 1 1 2 (m L r C K 1) で形質転換した。細菌を、健常マウスの全層創傷に毎日 1 回適用した後、ラクトバチルス・ロイテリを用いた処理の場合に述べたのと同様のプロトコールを行った。

【 0 1 4 9 】

m C X C L 1 2 1 の送達によって、創傷閉鎖が加速され (図 2 8)、このモデルにおける創傷サイズおよび露出が減少する (図 2 9) という明確な傾向がある。

【 0 1 5 0 】

実施例 1 6 : 組み替えタンパク質として送達される m C X C L 1 2 1、m C X C L 1 7、および m Y m 1 を用いた処理による創傷閉鎖にかかる時間に対する適度な効果

乳酸菌が可能にする送達および連続的なタンパク質産生の様式が、本機構に重要であるということを示すために、ネズミ変異体であるmCXC L 1 2 1、mCXC L 1 7、mYm 1 (60 μ L 中、合計200 ng、全てRnDシステム)または対照としての生理食塩水(10 μ L)を、毎日1回1時間、10分毎に創傷に送達した。

【0151】

mCXC L 1 2 1 の場合、30 ng を腹腔内に送達すると、3時間で免疫細胞の動員の顕著な上昇が誘導され、そのため、25 μ m²の範囲に200 ng は高用量であると見なされる。

【0152】

一時点において組み替えタンパク質として与えられると、創傷における高プロテアーゼ活性によってケモカインが分解され、そのため、タンパク質が創傷閉鎖を向上させるためには、細菌による新規の産生が必要となる。さらに、乳酸菌は、創傷治癒にとって有益な局所環境も提供し得る(図1B、4、5、24、30および31)。

【0153】

実施例17：健常マウスにおける創傷閉鎖に対する異なる処理の効果の比較

健常マウスにおける最初の24時間の創傷閉鎖を、行った全ての異なる処理に対して解析した(図32)。一時点において創傷に投与されるラクトバチルス・ロイテリR2LC__Lucまたは1回の用量が少ないCXC L 1 2 1 を用いた処理は、最初の24時間の治癒に影響を及ぼす。だが、10分毎に1時間、創傷表面に送達されるCXC L 1 2 1、CXC L 1 7、およびYm 1 は、最初の24時間の創傷閉鎖を加速する傾向があり、この効果は、CXC L 1 2 1 が、ラクトバチルス・ロイテリR2LC__LrCK 1 によって、連続的に1時間、創傷表面に送達される場合に、さらにより明確になる。真皮過剰発現によるCXC L 1 2 の送達は、24時間の創傷閉鎖にむしろ有害な影響を及ぼす。

【0154】

実施例18：pLAB 1 1 2__mLrCK 1.4を含有するラクトバチルス・ロイテリによって、粘膜表面の創傷治癒も加速される

創傷表面へのCXC L 1 2 の局所的連続送達が、肌の上皮および腸の上皮のどちらにおいても、包括的な機構によって機能するかを調べるために、DSS誘導性大腸疾患の実験プロトコルを2つ用いた。DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)は、腸の粘膜表面に創傷を誘導することが知られている(参考文献16)。

【0155】

第1のプロトコルでは、マウスを、14日間毎日1回、強制飼養(1 mLのOD0.5を遠心し、0.1 mLに再懸濁)によってラクトバチルス・ロイテリで処理する一方で、7~14日目には、DSSを飲料水に加えて与えた。ラクトバチルス・ロイテリのこの株は、本プロトコルを用いると、腸内でコロニーを形成するので、目的は、大腸疾患が誘導された際に、腸内でのラクトバチルス・ロイテリpLAB 1 1 2__mLrCK 1 の存在が、ラクトバチルス・ロイテリpLAB 1 1 2__Lucと比較して、有益なものであるかを評価することである。

【0156】

第2のプロトコルは、顕在化した大腸疾患を治療することを目的とし、1~8日目にDSSを飲料水に入れてマウスに与える一方で、5~8日目には、毎日3回、強制飼養によってラクトバチルス・ロイテリを与えた。

【0157】

大腸疾患の重症度を、体重減少、糞便の硬さ、および血液成分などの臨床パラメータに基づいて毎日評価し、クーパー(Cooper)および共同研究者によって詳細に説明されている得点法である(参考文献16)、疾患活性指数(DAI)で表した。

【0158】

ラクトバチルス・ロイテリpLAB 1 1 2__LucおよびpLAB 1 1 2__LrCK 1.4を用いた前処理によって、DSS誘導性大腸疾患の疾患活性が同様に改善した(図3

10

20

30

40

50

3)。これは、この効果が、ラクトバチルス・ロイテリのみによっていることを示している。

【0159】

対照的に、大腸疾患発症マウスに、ラクトバチルス・ロイテリ pLAB112__LrC K1.4 を投与した場合、疾患の進展が改善されたが、これは pLAB112__Luc で処理した場合には観察されず（図34）、このことは、送達されたケモカインの効果を示している。

参考文献

1. Demidova-Rice TN, Hamblin MR and Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in skin & wound care*. 2012;25:304-14. 10
2. Demidova-Rice TN, Hamblin MR and Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Advances in skin & wound care*. 2012;25:349-70.
3. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ and Oppenheim JJ. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1. *The American Journal of Pathology*. 1999;154:1125-1135. 20
4. Hattermann K, Sebens S, Helm O, Schmitt AD, Mentlein R, Mehdorn HM and Held-Feindt J. Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncology reports*. 2014;32:270-6.
5. Badillo AT, Chung S, Zhang L, Zoltick P and Liechty KW. Lentiviral gene transfer of SDF-1alpha to wounds improves diabetic wound healing. *The Journal of surgical research*. 2007;143:35-42.
6. Lee WY, Wang CJ, Lin TY, Hsiao CL and Luo CW. CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304:E32-40. 30
7. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, Valle-Rios R, Hevezi PA, Zuniga J, Selman M, Ouellette AJ and Zlotnik A. CXCL17 Is a Mucosal Chemokine Elevated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis That Exhibits Broad Antimicrobial Activity. *The Journal of Immunology*. 2012;188:6399-6406.
8. Goren I, Pfeilschifter J and Frank S. Uptake of Neutrophil-Derived Ym1 Protein Distinguishes Wound Macrophages in the Absence of Interleukin-4 Signaling in Murine Wound Healing. *Am J Pathol*. 2014.
9. Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, Ibrahim YM, Chatzigiagkos A, Alm EJ and Erdman SE. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One*. 2013;8:e78898. 40
10. Ramos AN, Cabral ME, Nosedá D, Bosch A, Yantorno OM and Valdez JC. Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa*: the potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2012;20:552-62.
11. Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH and Axelsson L. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*. 2005;151:2439-2449.
12. Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H and Nes IF. Produc 50

tion of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002;81:639-54.

13. Gao Z, Tseng C-h, Pei Z and Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104:2927-2932.

14. Gethin G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK*. 2007;3:52-56.

15. Sorvig E, Gronqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VG, and Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 229(1):119-126.

16. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest*. 1993;69(2):238-249.

17. Nyman E, Huss F, Nyman T, Junker J, Kratz G. Hyaluronic acid, an important factor in the wound healing properties of amniotic fluid: in vitro studies of re-epithelialisation in human skin wounds. *J Plast Surg Hand Surg*. 2013 Apr;47(2):89-92.

18. Vagesjo E, Christoffersson G, Walden T, Carlsson P, Essand M, Korsgren O, and Phillipson M. Immunological shielding by induced recruitment of regulatory T lymphocytes delays rejection of islets transplanted to muscle. *Cell transplantation*. 2015;24(2):263-76.

19. Bohmer N, Konig S and Fischer L. A novel manganese starvation-inducible expression system for *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 342 (2013) 37-44.

20. Duong, T, Miller, M., Barrangou, R., Azcarate-Peril A. and Klaenhammer T., Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus* mbt_200 357.. *Microbial Biotechnology* (2010) 4(3), 357-367.

21. Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VG, and Axelsson L. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*. 2005 Jul;151(Pt 7):2439-49.

22. Nesmelova I, Sham Y, Gao J, and Mayo K. CXC and CC chemokines form mixed heterodimers association free energies from molecular dynamics simulations and experimental correlations. *JBC Papers in Press*, June 12, 2008, DOI 10.1074/jbc.M803308200

23. Bellocq A, Suberville S, Philippe C, Bertrand F, Perez J, Fouqueray B, Cherqui G, Baud L. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5086-92.

24. Thompson J, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.

25. Myers E and Miller W, Optimal alignments in linear space. (1988) *CABIOS*, 4: 11-17.

26. W. R. Pearson and D. J. Lipman. Improved Tools for Biological Sequence Analysis (1988) *PNAS*, 85:2444-2448.

27. W, R. Pearson (1990), Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.*, 183: 63-98,

28. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search

10

20

30

40

50

h programs. Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402.

29. Holm L and Sander C. Protein structure comparison by alignment of distance matrices (1993) J. Mol. Biol., 233: 123-38; 9.

30. Holm L and Sander C. Dali: a network tool for protein structure comparison. (1995) Trends Biochem. Sci., 20: 478-480.

31. Holm L and Sander C. Touring protein fold space with Dali/FSSP. (1998) Nucleic Acid Res., 26: 316-9).

32. Massena S, Christoffersson G, Vagesjo E, Seignez C, Gustafsson K, Binet F, Herrera Hidalgo C, Giraud A, Lomei J, Westrom S, Shibuya M, Claesson-Welsh L, Gerwins P, Welsh M, Kreuger J, Phillipson M. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. Blood. 2015 Oct 22;126(17):2016-26. doi: 10.1182/blood-2015-03-631572. Epub 2015 Aug 18.

33. Hatse S, Princen K, Liekens S, Vermeire K, De Clercq E, Schols D. Fluorescent CXCL12AF647 as a novel probe for nonradioactive CXCL12/CXCR4 cellular interaction studies. Cytometry A. 2004 Oct;61(2):178-88.

34. Drury L, Ziarek J, Gravel S, Veldkamp C, Takekoshi T, Hwang S, Heveker N, Volkman B and Dwinella M. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. PNAS October 25, 2011, vol. 108, no. 43, pages 17655-17660

配列

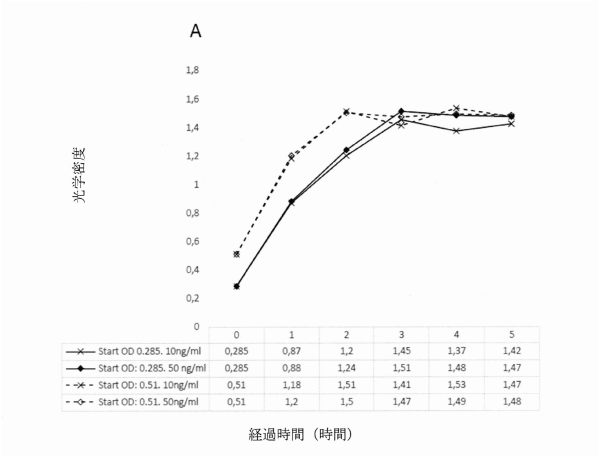
【 0 1 6 0 】

【表 4】

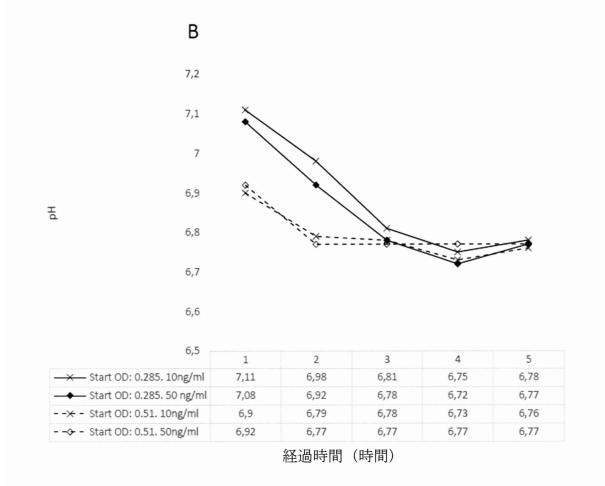
表 I V : 配列一覧

配列番号	説明
1.	mL r C K 1 _ _ o p t DNA
2.	mL r C K 1 _ _ o p t タンパク質
3.	mC X C L 1 2 天然タンパク質
4.	h L r C K 1 _ _ o p t DNA
5.	h L r C K 1 _ _ o p t タンパク質
6.	h C X C L 1 2 天然タンパク質
7.	mL r C K 2 _ _ o p t DNA
8.	mL r C K 2 _ _ o p t タンパク質
9.	mC X C L 1 7 天然タンパク質
10.	h L r C K 2 _ _ o p t DNA
11.	h L r C K 2 _ _ o p t タンパク質
12.	h C X C L 1 7 天然タンパク質
13.	mY m 1 _ _ o p t DNA
14.	mY m 1 タンパク質
15.	mY m 1 天然タンパク質
16.	h Y m 1 _ _ o p t DNA
17.	h Y m 1 タンパク質
18.	h Y m 1 天然タンパク質
19.	S p p I P ; 活性化ペプチド
20.	p S I P 4 1 1 DNA
21.	p S I P 4 1 1 タンパク質
22.	PCRプライマー
23.	PCRプライマー
24.	p V A X 1 DNA
25.	p C T R DNA 挿入断片
26.	p C X C L 1 2 DNA 挿入断片

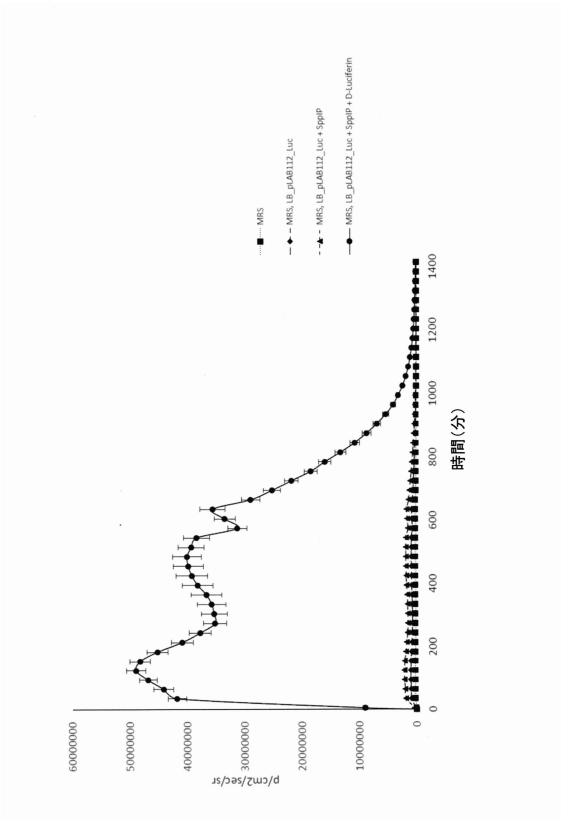
【図 1 A】



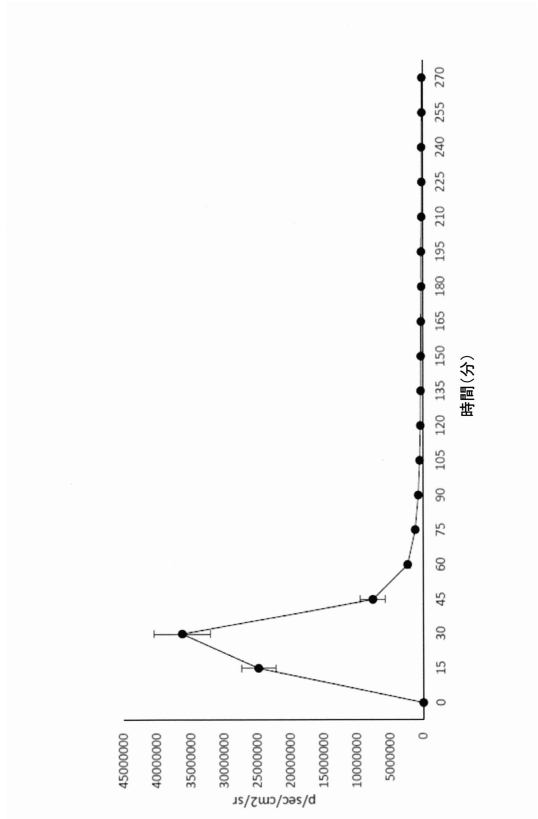
【図 1 B】



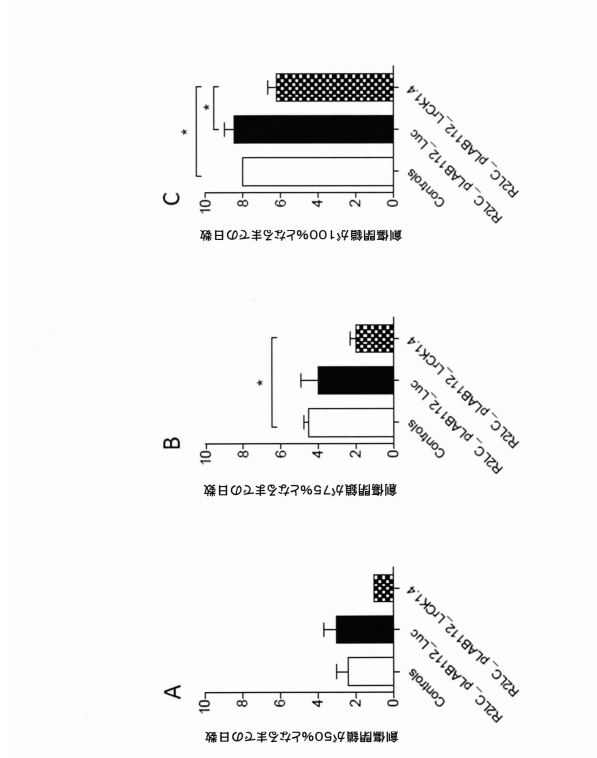
【図 2】



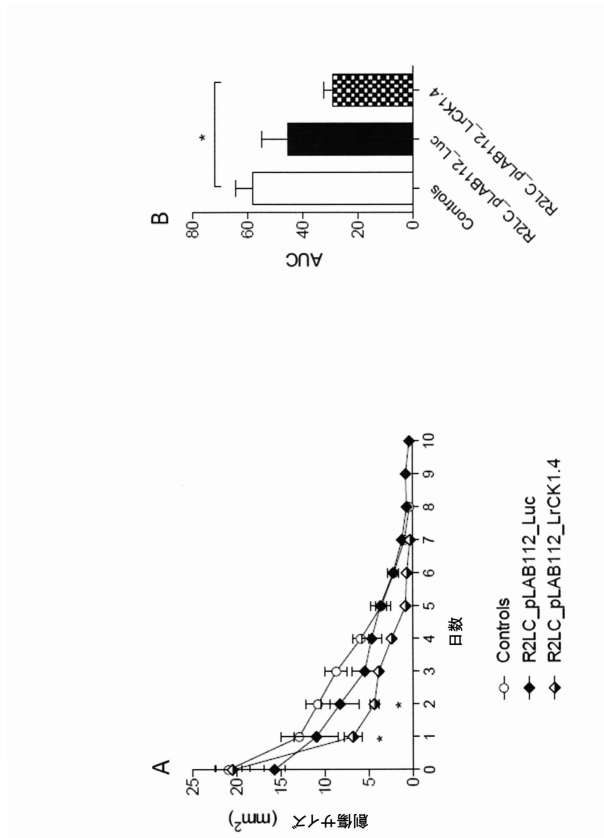
【図 3】



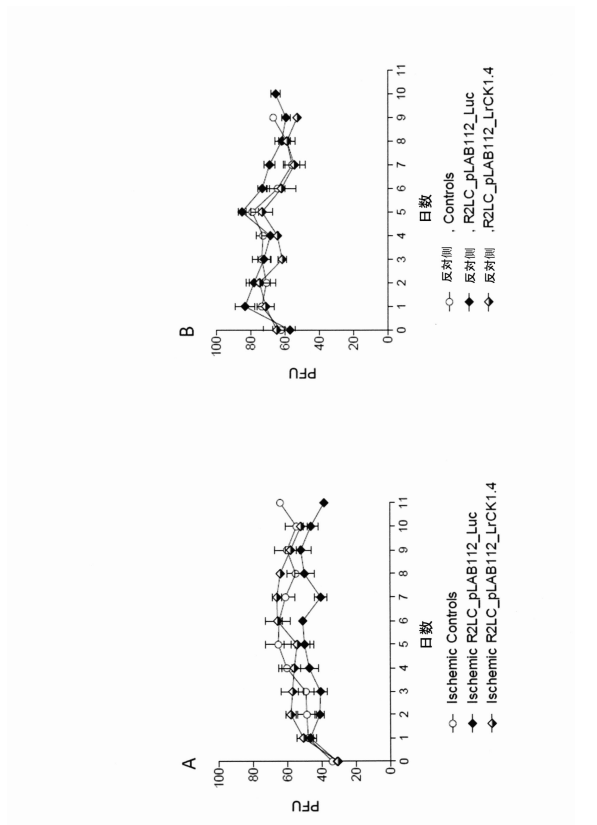
【図 4】



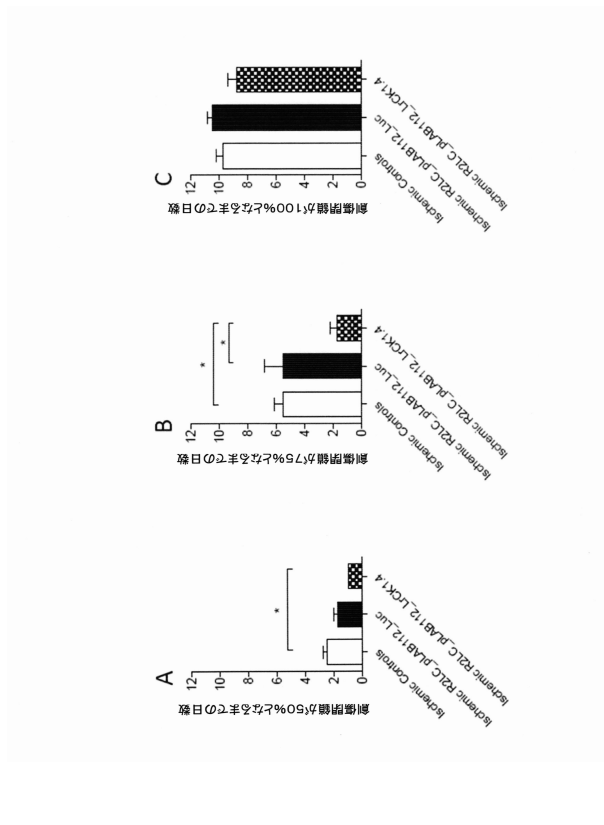
【図 5】



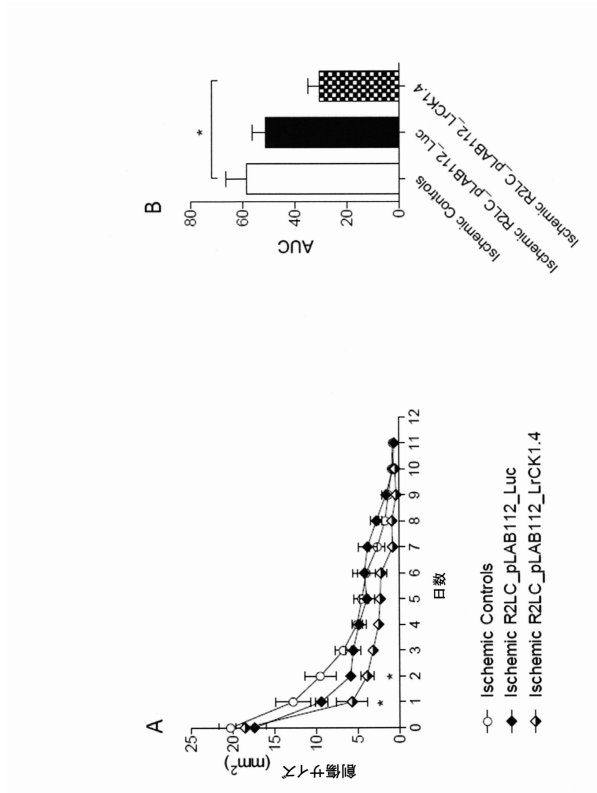
【図 6】



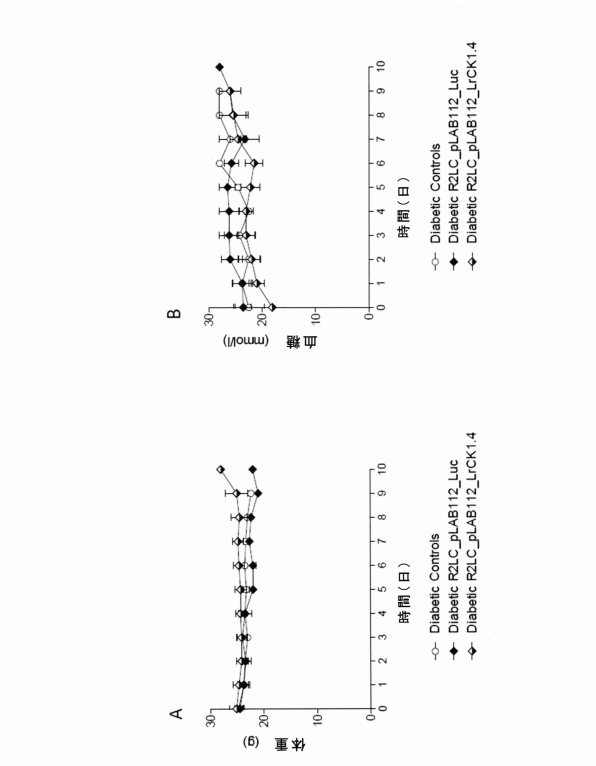
【図 7】



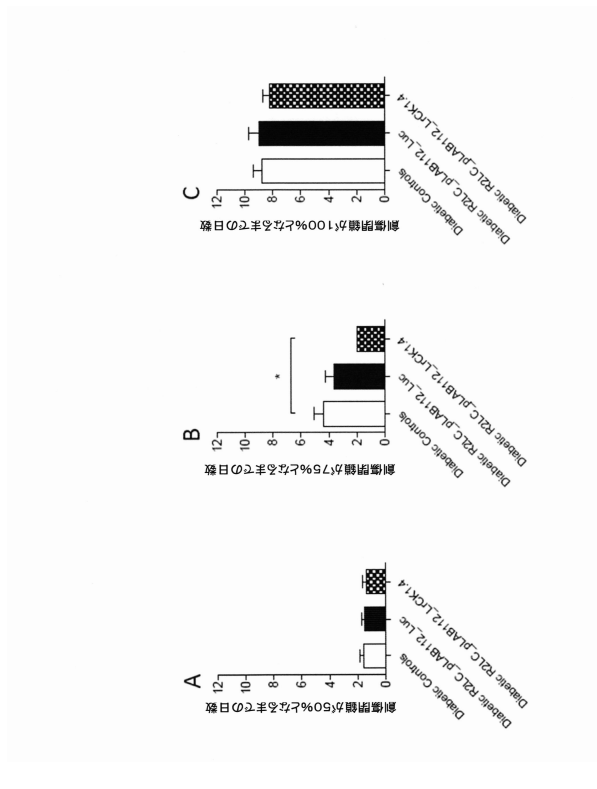
【図 8】



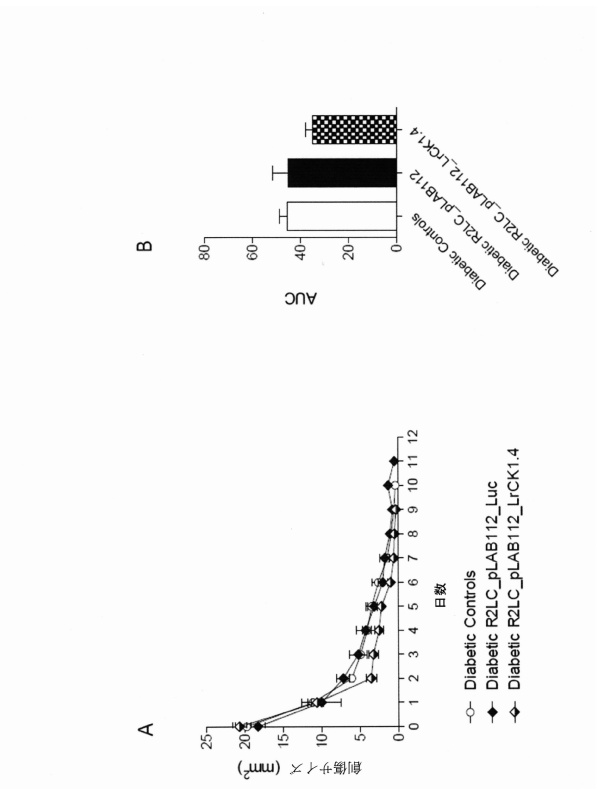
【図 9】



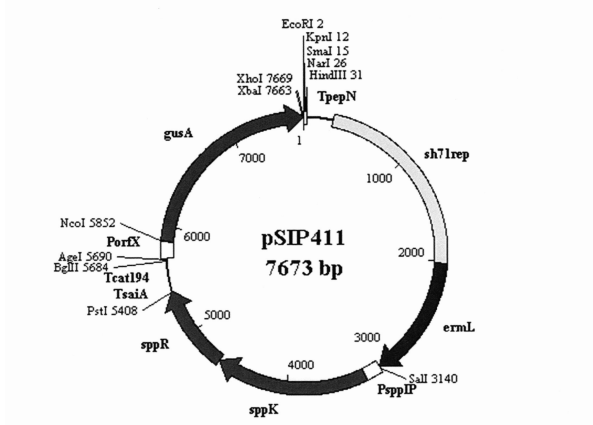
【図 10】



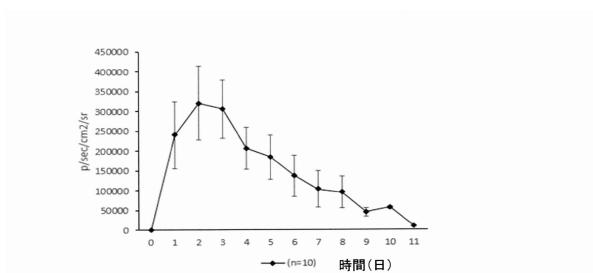
【図 11】



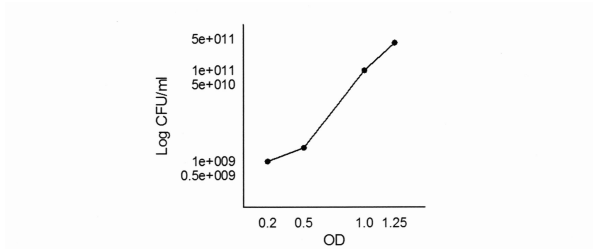
【図 12】



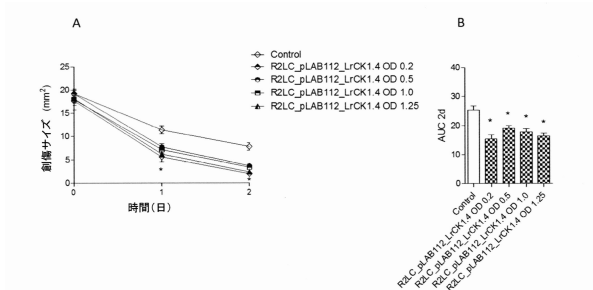
【図 13】



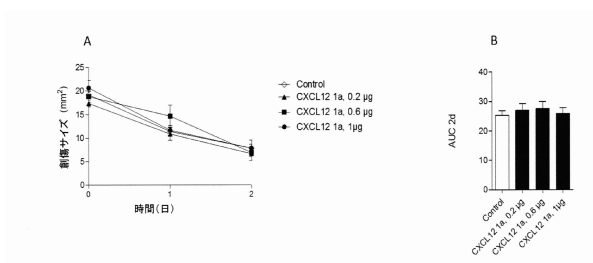
【図 16】



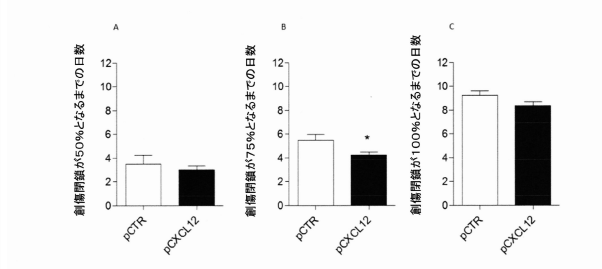
【図 17】



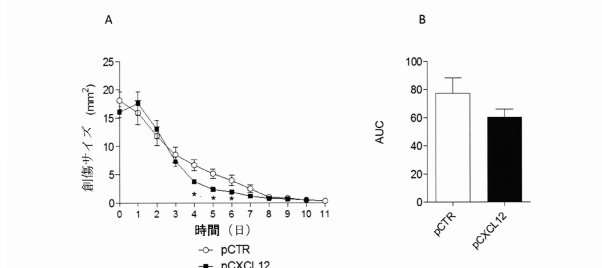
【図 18】



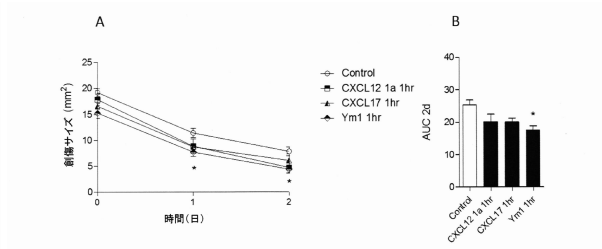
【図 14】



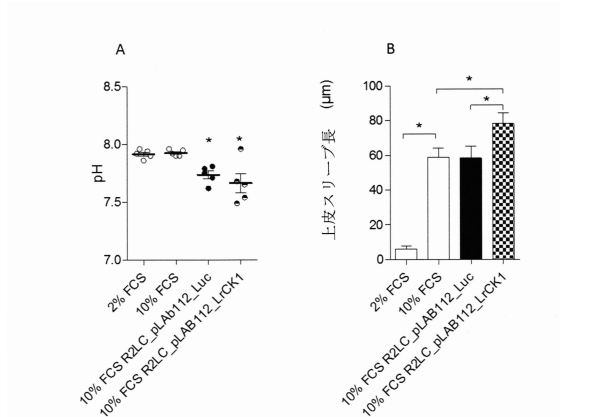
【図 15】



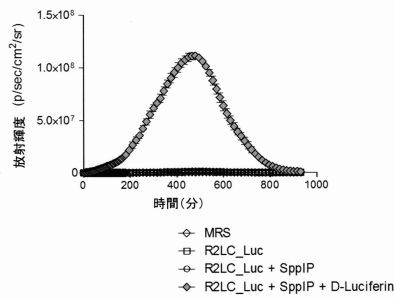
【図 19】



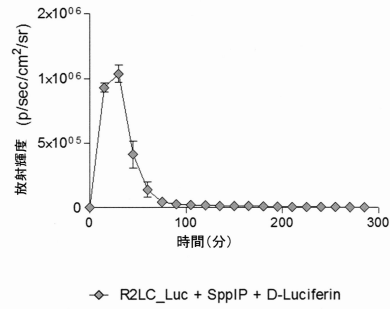
【図 20】



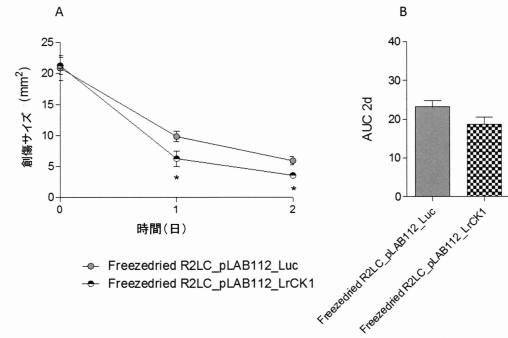
【図 2 1】



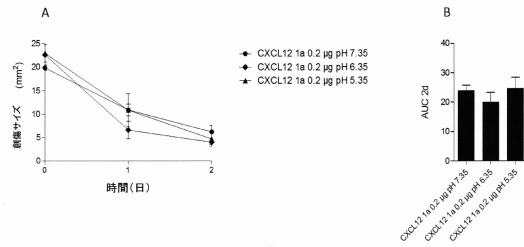
【図 2 2】



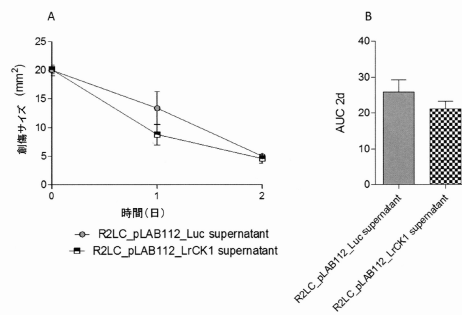
【図 2 3】



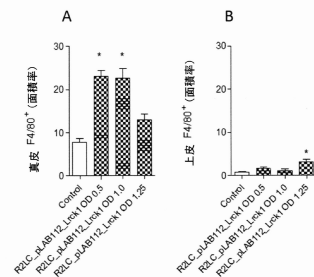
【図 2 4】



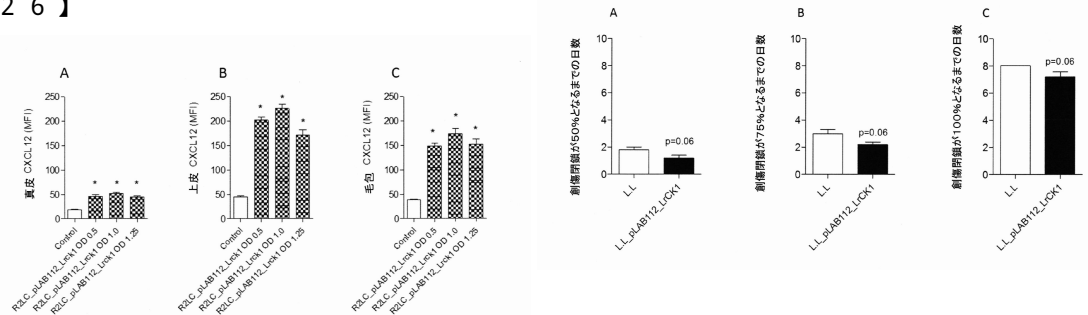
【図 2 5】



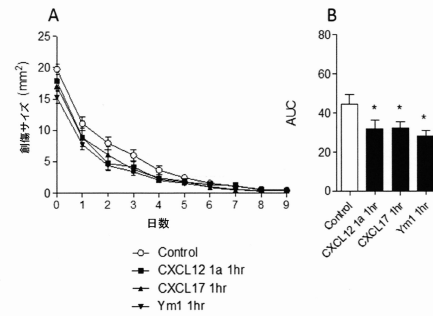
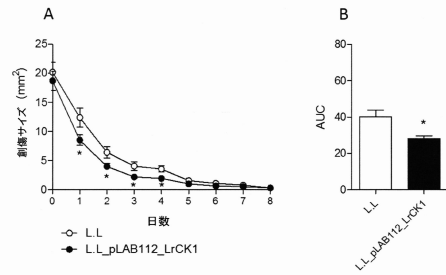
【図 2 7】



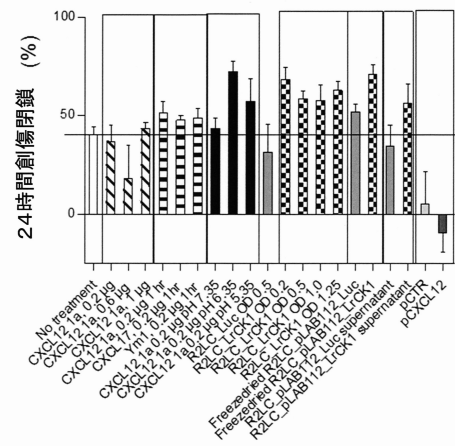
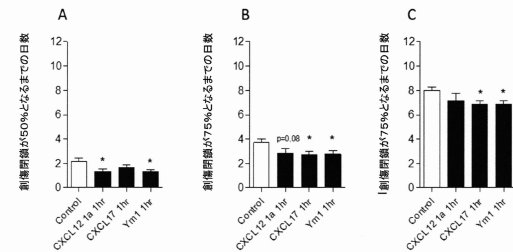
【図 2 8】



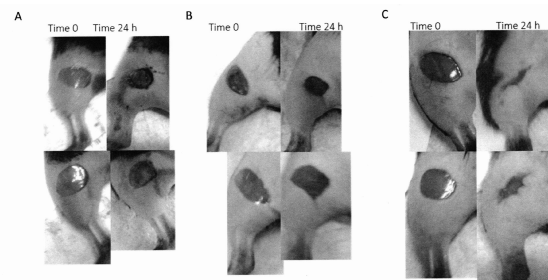
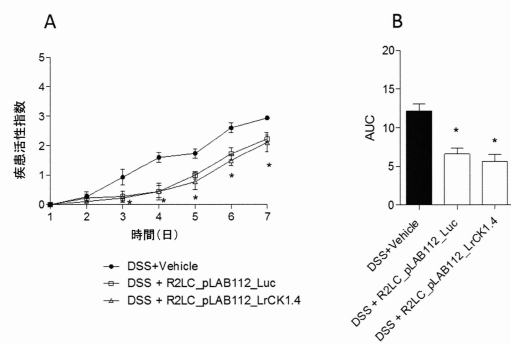
【 図 3 1 】



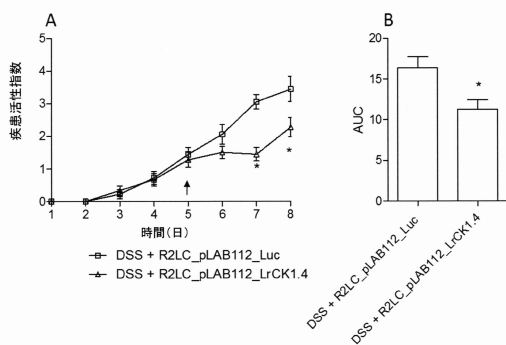
【 図 3 2 】



【 図 3 5 】



【 図 3 4 】



【配列表】

0006581208000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21

(56)参考文献 特表2000-508162(JP,A)
 Med. Hypotheses, 2009年, Vol.73, p.860
 Biomaterials, 2013年, Vol.34, pp.9393-9400
 Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2013年, Vol.304, pp.E32-40
 Am. J. Pathol., 2014年10月 7日, Vol.184, pp.3249-3261
 Microbiology, 2005年, Vol.151, pp.2439-2449
 Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012年, Vol.96, pp.171-181
 PLoS One, 2013年, Vol.8, e78898

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 5 / 7 4 7
 A 6 1 K 3 8 / 1 9
 A 6 1 L 1 5 / 3 6
 A 6 1 P 1 7 / 0 2
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q