

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第3部門第2区分  
 【発行日】平成17年7月7日(2005.7.7)

【公開番号】特開2003-192541(P2003-192541A)  
 【公開日】平成15年7月9日(2003.7.9)  
 【出願番号】特願2001-393777(P2001-393777)  
 【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 7/06  
 A 6 1 K 35/64  
 A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 P 17/14  
 A 6 1 P 43/00  
 // C 0 7 K 14/435

【F I】

A 6 1 K 7/06  
 A 6 1 K 35/64  
 A 6 1 P 17/14  
 A 6 1 P 43/00 1 1 1  
 A 6 1 K 37/02  
 C 0 7 K 14/435 Z N A

【手続補正書】  
 【提出日】平成16年11月4日(2004.11.4)  
 【手続補正1】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】0011  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【0011】

(3) 分子量57キロダルトンの糖蛋白質によるVEGF産生促進の検討：ヒト頭髮毛乳頭細胞産生からのVEGF産生促進

分子量57キロダルトンの糖蛋白質は、平滑筋系細胞（大動脈平滑筋細胞、気管支／気管平滑筋細胞、冠状動脈平滑筋細胞、肺動脈平滑筋細胞、臍帯動脈平滑筋細胞、子宮平滑筋細胞等）、上皮系細胞（乳腺上皮細胞、腎臓皮質上皮細胞、気管支／気管上皮細胞、前立腺上皮細胞、腎臓近位尿細管上皮細胞、肺胞上皮細胞、小気道上皮細胞等）、マクロファージ、肝細胞、毛乳頭細胞等からのVEGF（VEGF-A, VEGF165, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E）産生を著しく促進する。ここでは、ヒト頭髮毛乳頭細胞（THPC-001）トータルキット（HDPCTトータルキット：THPCK-001、製造元：セルアプリケーションズインク USA、輸入販売元：東洋紡績株式会社）を用いて、常法によりヒト毛乳頭細胞を培養し、分子量57キロダルトンの糖蛋白質によるVEGF産生促進活性を調べた。解凍した細胞を懸濁するためのPCGM培地を10mL、15mL遠心チューブに分注し、氷冷しておく。即ち、凍結したヒト頭髮毛乳頭細胞（THPC-001）の入ったバイアル瓶を37℃の恒温槽で急速に融解する。このバイアル瓶にPCGM培地を1mL程度徐々に滴下しDMSOを希釈後、全量をPCGM培地が入った遠心チューブに移し懸濁させる。浮遊細胞を冷却低速心機で4℃、1000rpm、5分間遠心する。沈殿した細胞を吸わないように注意しながら上清を吸引し、1mLPCGM培地に再懸濁させる。この全量を、コラーゲン液でコートしたT-75フラスコに植え込み、5%CO<sub>2</sub>、加湿下で37℃に保たれたインキュベーターに入れ静置培養を行う。1日後、培地の交換を行う。以後、1日おきに培地の交換を行い継代培養をする。尚、PCGM培地成分は

、1% FBSを含有するPCGM基礎培地250 mLに牛下垂体抽出液(BPE)100倍希釈液を2.5 mL、牛胎児血清(FCS)100倍希釈液を2.5 mL、インシュリン・トランスフェリン・トリヨードサイロニン溶液(ITT)200倍希釈液を1.25 mL、サイロプロテイン溶液(Cyp)200倍希釈液を1.25 mLを添加したものをを用いた。尚、分子量57キロダルトンの糖蛋白質の添加系及び無添加系によりVEGF産生促進の検討を行った。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

(7) 分子量57キロダルトンの糖蛋白質による内皮細胞増殖促進の検討

分子量57キロダルトンの糖蛋白質は、ウシ頸動脈由来内皮細胞、ヒト大動脈由来内皮細胞、ウシ大動脈由来内皮細胞、ヒト冠動脈由来内皮細胞、ラット冠動脈由来内皮細胞、ヒト臍帯動脈由来内皮細胞、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞、ヒト腸骨動脈由来内皮細胞、ヒト肺動脈由来内皮細胞、ヒト肺静脈由来内皮細胞などの大血管由来内皮細胞、ヒト皮膚微小血管由来内皮細胞、ヒト肺微小血管由来内皮細胞、ヒト子宮筋層微小血管由来内皮細胞、ヒト角膜内皮細胞、ウシ角膜内皮細胞、肝類洞内皮細胞等の内皮細胞の増殖活性を示す。更に、ヒト大動脈由来内皮細胞(HAEC, Code: C2535, Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト冠動脈由来内皮細胞(HCAEC, Code: C2585, Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト腸骨動脈由来内皮細胞(HIAEC, Code: C2545, Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト皮膚微小血管由来内皮細胞(HMVEC-d, Code: , Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト肺微小血管由来内皮細胞(HMVEC-L, Code: C2527, Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト肺動脈由来内皮細胞(HPAEC, Code: C2530, Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト臍帯動脈由来内皮細胞(HUAEC, Code: C2520, Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC, Code: , Bio Whittaker Co. Ltd.)、ヒト子宮筋層微小血管由来内皮細胞(UtMVEC, Code: C2564, Bio Whittaker Co. Ltd.)、正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞トータルキット(製造元: セルアプリケーションズインクUSA、輸入販売元: 東洋紡績株式会社)を用いるのが市販されていて便利である。ここでは、正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞トータルキット(製造元: セルアプリケーションズインクUSA、輸入販売元: 東洋紡績株式会社)を用いて、常法により正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞を培養し、分子量57キロダルトンの糖蛋白質の増殖活性を調べた。凍結正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞入りのアンプルを、37℃の恒温槽に一分間浸し細胞を素早く解凍する。アンプルの細胞浮遊液500 µLをイクストラセルーマトリックスプロテインコートフラスコ(7.5 mLのCADMEC Growth Mediumを入れてあったもの)に入れ、細胞が均一分散するように揺らす。このフラスコをインキュベーター(37℃, 5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下)中で、ガス交換ができるようにフラスコのキャップを緩め静置培養する。8時間又は一晩培養後に、培地中のDMSOの影響をなくす為に培地交換をする。尚、分子量57キロダルトンの糖蛋白質添加系及び無添加系により内皮細胞増殖促進の検討を行った。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

(8) 正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞に対する増殖促進作用の測定方法

分子量57キロダルトンのタンパク質を最大95%濃度まで、正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞の培養培地であるCADMEC Growth Mediumに添加し、発明の実施の形態の(7)に示した通りに正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞を培養し、48時間後の正

常ヒト皮膚微小血管内皮細胞に対する増殖促進作用をMTT法により分析した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

(11) 分子量57キロダルトンの糖蛋白質のウシ頸動脈由来内皮細胞に対する管腔形成促進作用の測定方法： コラーゲンゲル間サンドイッチ培養法 (Atherosclerosis, 92, 141, 1992又は、Virchows Arch. B Cell Pathol., 60, 245, 1991)

分子量57キロダルトンの糖蛋白質を以下の管腔形成実験系の細胞に無菌的に投与し管腔形成を観察した。ウシ頸動脈由来内皮細胞は、10% FBS添加のイーグルズ最小培地 (MEM: Gibco Laboratories, NY)、37℃、5%  $\text{CO}_2$  の条件下でインキュベーターで培養された。この実験で用いた細胞は、継代6～10回培養されたものを用いた。管腔形成実験は、直径22mmの12ウェルプレートを用い、10% FBS含有MEM中にウシ頸動脈由来内皮細胞密度が $1 \times 10^5$ 細胞/1.5mLが、Vitrogen 100 (Collagen CO., CA) が8、0.1N NaOHが1、 $\times 10$  MEM (pH 7.4) が1の体積比の混合物からなる0.75mLのコラーゲンゲルの入ったウェルプレートに播種され、24時間インキュベートされた。この培地は、吸引され、ウシ頸動脈由来内皮細胞上を0.5mLのコラーゲンゲルにより積層し、そこに2% FBSを添加及び、分子量57キロダルトンの糖蛋白質を加えたMEM 1.5mを加えインキュベートされ、3日に一度培地を交換し培養された。これにより、分子量57キロダルトンの糖蛋白質の管腔形成の影響を観た。尚、ネガティブコントロールとして、分子量57キロダルトンの糖蛋白質を加えない系を、ポジティブコントロールとしてインスリン100  $\mu\text{U}/\text{mL}$ を加えた。形態学的変化は、位相差光学顕微鏡 (Olympus phase contrast IMT2) により観察し、顕微鏡写真を33倍で撮った。各培養容器から無差別に5箇所選択し、管状構造は10個の写真からトレースして、管の長さが組織分析システム (TAS plus, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, F. R. G.) により決定された。管の長さは、次式に示させる。

特異的長さ ( $\text{mm}^{-1}$ ) = 合計管の長さ (mm) / 合計面積 ( $\text{mm}^2$ )

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

<実施例13～16>

ウシ頸動脈由来内皮細胞に対する分子量57キロダルトンの糖蛋白質の管腔形成の影響実施の形態の(11)のウシ頸動脈由来内皮細胞に対する管腔形成促進作用の測定方法に従って、分子量57キロダルトンの糖蛋白質を各濃度1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、添加し、ウシ頸動脈由来内皮細胞に対する管腔形成促進作用を求めた。(尚、ネガティブコントロールとして、分子量57キロダルトンの糖蛋白質を加えない系を、ポジティブコントロールとしてインスリン100  $\mu\text{U}/\text{mL}$ を加えた。) 結果を表4に示す。分子量57キロダルトンの糖蛋白質は、ウシ頸動脈由来内皮細胞に対して著しい管腔形成促進作用を示した。分子量57キロダルトンの糖蛋白質の10ng/mL添加系が最もウシ頸動脈由来内皮細胞に対して管腔形成を促進した。(尚、表4の結果は、3回の実験結果の平均値とS.E.M.を示す)