

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年6月5日(05.06.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/084027 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61P 27/16 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 39/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/080382

(22) 国際出願日: 2013年11月11日(11.11.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-259816 2012年11月28日(28.11.2012) JP

(71) 出願人: 独立行政法人放射線医学総合研究所
(NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 中山 文明 (NAKAYAMA Fumiaki); 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 梅田 禎子 (UMEDA Sachiko); 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 安田 武嗣 (YASUDA Takeshi); 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 藤田 真由美 (FUJITA Mayumi); 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 今井 高志 (IMAI

Takashi); 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人浅村特許事務所 (ASAMURA PATENT OFFICE, P.C.); 〒1408776 東京都品川区東品川2丁目2番24号 天王洲セントラルタワー Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MEDICAL USES OF CELL MEMBRANE-PERMEABLE FIBROBLAST GROWTH FACTOR

(54) 発明の名称: 細胞膜透過性の線維芽細胞増殖因子の医療用途

(57) Abstract: A chimeric protein comprising FGF1 or FGF2 fused to CPP that contains the CPP-C domain of FGF11, FGF12, FGF13 or FGF14; and a DNA molecule containing a DNA sequence encoding FGF1 or FGF2 and a DNA sequence encoding CPP-C, or a vector containing these DNA sequences. The chimeric protein, DNA molecule or vector is usable in a drug or therapy method that is efficacious in a tissue wherein the expression of FGFR is low or lowered for some reason, a drug or therapy method that is capable of further enhancing the FGFR-mediated physiological activity of FGF1 or FGF2, or a drug or therapy method for protecting a stem cell from the effects of radiation exposure, chemotherapy, etc.

(57) 要約: 本発明は、FGF1又はFGF2に、FGF11、FGF12、FGF13及びFGF14の何れかのCPP-Cドメインを含むCPPを融合したキメラタンパク質; 或いはFGF1又はFGF2をコードするDNA配列と、CPP-CをコードするDNA配列とを含むDNA分子又はこれらのDNA配列を含むベクターに関する。これらキメラタンパク質、DNA分子、又はベクターは、FGFRの発現の低い又は何らかの原因で低くなった組織で有効な医薬又は治療方法、FGFRを介するFGF1又はFGF2の生理活性をより増強できる医薬又は治療方法、或いは放射線照射や化学療法等による影響から幹細胞を保護する手医薬又は治療方法に用いることができる。



WO 2014/084027 A1

明 細 書

発明の名称：細胞膜透過性の線維芽細胞増殖因子の医療用途

技術分野

[0001] 本発明は、細胞膜透過性の線維芽細胞増殖因子に関する。より具体的には、線維芽細胞増殖因子（以下、FGFと略称する）に細胞膜透過ペプチド（以下、CPPと略称する）を融合したキメラタンパク、又はその医薬用途又は細胞培養用途に関する。

背景技術

[0002] FGFは、哺乳動物の細胞増殖を刺激する生理活性物質であり、現在7つのサブファミリーに分類される23のメンバーが同定されている。FGFの多くのメンバーは、線維芽細胞増殖因子受容体（以下、FGFRと略称する）と相互作用し細胞内ドメインでチロシンキナーゼを活性化することで生じるシグナル伝達を通じて生理活性を発揮する（非特許文献1乃至24のイントロダクションなどを参照）。FGFRファミリーは、FGFR1乃至FGFR4の4種類を含み、FGFR1乃至FGFR3は、それぞれ、FGFR1a、FGFR1b及びFGFR1c、FGFR2a、FGFR2b及びFGFR2c、並びにFGFR3a、FGFR3b及びFGFR3cのサブグループを有する（例えば、非特許文献1及び17）。また、bサブグループは、上皮組織等で発現し、cサブグループは、間葉組織等で発現していることが知られている（例えば、非特許文献1及び17）。

[0003] FGF1（酸性線維芽細胞増殖因子と称されることもある）は、FGF2（塩基性線維芽細胞増殖因子と称されることもある）と同じサブファミリー（FGF1サブファミリー）に属し、FGF2と類似の生理活性を有する。しかし、FGF2は、上皮細胞に特異的に発現しているFGFR2bとの相互作用が弱いのに対して、FGF1は、総てのFGFRと相互作用し得るという特徴を有する（非特許文献1）。また、FGF1は、CSNK2B、CSNK2A2、HSPA9、S100A13、カゼインキナーゼ2、及びF

I B Pとも相互作用することが知られている（非特許文献25～29）。このため、F G F 1は、発生期だけでなく、成人においても、脳、眼、腎臓、胎盤及び副腎組織などさまざまな中胚葉由来組織及び神経外胚葉組織で、様々な生理学的活性に関与している可能性があり、虚血性心疾患の治療（非特許文献11）、重症下肢虚血での血管新生（非特許文献12）、糖尿病マウスにおける皮膚潰瘍の治癒（非特許文献13）、鼓膜穿孔の治療（非特許文献14）、放射線による腸管障害の予防及び治療（非特許文献2）、放射線による毛包の障害の予防（非特許文献15）、幹細胞の維持（非特許文献16）、並びにがん細胞の遊走や浸潤の抑制（非特許文献17）などについて検討が行われている。

[0004] 一方、F G F 1は、F G F 2と異なり、ヘパリンやヘパラン硫酸（H S）と複合体を形成しないと不安定であり、生理活性を発揮できない。このような特性を改善するために、F G F 1のアミノ酸の一部を置換して、構造を安定化する試みがなされている（非特許文献9、10及び19）が、実際に医薬品として上市されているのは、現在のところ、F G F 2を有効成分とする創傷治癒薬（一般名トラフェルミン）と、F G F 7を有効成分とする放射線化学療法における口腔粘膜炎の予防及び治療薬（一般名パリフェルミン）である。

[0005] F G F 1の作用機序について幾つかの詳細な報告がなされており、F G F 1により細胞分裂及び増殖などの生物学的活性を発揮するには、F G F Rとの相互作用によるシグナル伝達と共にF G F 1が核内に移行することが必要であると報告されている（非特許文献3～5）。例えば、W i e d l o c h a等は、C A A Xで標識したF G F 1を使用する実験で、F G F 1が核内に移行してD N A合成を刺激すること、並びにF G F R 1の細胞内への移行は、F G F 1のF G F Rへの結合が必要であることを報告している（非特許文献3）。また、今村等は、核移行配列を欠くF G F 1及び核移行配列を回復したF G F 1をF G F Rとの相互作用可能な条件でL E - 1 1細胞に加えたところ、核移行配列を欠くF G F 1は細胞分裂活性を発揮しなかったが、核

移行配列を有する FGF 1 では細胞分裂活性を有することを報告する（非特許文献 5）。また、Wiedlocha 等は、ジフテリア毒素 A を FGF 1 に融合させたキメラタンパク質を作成し、このキメラタンパク質をジフテリア毒素 A 受容体を介して細胞内に移行させたところ、DNA 合成が促進されたことを報告している（非特許文献 4）。この報告は、FGF 1 の核内移行が、細胞分裂活性又は細胞増殖と何らかの関連を持つことを示唆するが、FGFR を介さずに、FGF 1 を細胞内に移行させた場合には、DNA の合成に止まることを示すものでもある。Wiedlocha 等は、この報告で、細胞分裂及び増殖に係わる他のプロセスで FGFR でのチロシンキナーゼの活性化が要求されているだろうと結論付けている。

[0006] Wiedlocha 等はまた、CPP の 1 種であるジフテリア毒素 A を FGF 1 に融合させたキメラタンパク質は、ヘパリンを欠く条件では、ジフテリア毒素 A 受容体を介して細胞内に移行するが、ヘパリンの存在下では細胞内に移行しないことを報告しており、CPP を融合させたキメラタンパク質ではヘパリンによって細胞膜の通過が妨げられることを教示する（非特許文献 4 及び 24）。

FGF 2 の作用機序については、非特許文献 23 などにおいて、FGF 1 と同様に、FGFR を介したシグナル伝達及び細胞内移行、並びに細胞内での作用について報告されている。

[0007] FGF 1 又は FGF 2 の薬理的又は生物学的活性に関するこれまでの検討は、このような FGF 1 又は FGF 2 の作用機序を前提にする。すなわち、病巣部又は障害を受けた組織の細胞が FGFR を発現していることを前提に、FGF 1 又は FGF 2 を FGFR と相互作用させて、FGFR を介したシグナル伝達及び FGF 1 又は FGF 2 の細胞内移行を通じて所望の活性を発生させようとするものである。もっとも、抗アポトーシス効果の作用機序は明らかになっていないというのが現状である。

[0008] 例えば、Meyer 等は、FGFR 1 及び 2 を欠くケラチノサイトでは、ケラチノサイトの遊走が遅滞して創傷皮膚が遅くなることを報告し、FGF

R 1 又は F G F R 2 の存在が、創傷皮膚の治癒に必須であると結論付けている（非特許文献 2 2）。

[0009] 萩原等は、放射前後における空腸での F G F R 発現のプロファイルとの関連において、F G F 1 が、他の F G F ファミリーメンバーに対して、放射線による腸管の障害の予防及び治療に関して優位性を有することを報告する（非特許文献 2）。

[0010] P a l m e n 等は、虚血性心疾患での機能回復に F G F 1 が有効であり、この作用は、F G F R を介する細胞内シグナル伝達系によることを報告する（非特許文献 1 1）。また、N i k o l 等は、重症虚血肢を有する患者に N V 1 F G F を筋肉投与し局所発現させたところ、切断リスクが有意に減少したことを報告する（非特許文献 1 2）。ただし、潰瘍の治癒に関しては、投与群は非投与群に対して優位差がなかったと報告されている。

[0011] G o l d m a n 等は、穿孔した鼓膜に F G F 1 を投与した試験結果を報告する（非特許文献 1 4）。

[0012] M e l l i n 等は、糖尿病マウスにおける皮膚潰瘍への F G F 1 の投与が投与量に依存して創傷治癒を促進したことを報告する（非特許文献 1 3）。

[0013] C h e n 等は、F G F による F G F R の活性化を示す E R K 1 / 2 リン酸化及び多能性を示す N A N O G 発現を指標に、Q 4 0 P、S 4 7 I、及び H 9 3 G の 3 つのアミノ酸置換を導入した熱安定性の変異 F G F 1 によって、E S 細胞及び i P S 細胞の自己増殖能及び多能性が維持されることを報告する（非特許文献 1 6）。

[0014] L i u 等は、腫瘍細胞では、F G F R 1 c が支配的に発現されるが F G F R 1 b の発現は低い点に着目し、膵臓癌細胞株で F G F R 1 b を強制的に過剰発現させてから F G F 1 等を投与することにより癌細胞の増殖、遊走及び浸潤が抑制されることを報告する（非特許文献 1 7）。

[0015] 中山等は、抜毛により毛包を成長期へと誘導した B A L B / c マウスの脱毛した皮膚に、F G F 1 を投与した後に、放射線の照射による毛包細胞のアポトーシスを誘発したところ、アポトーシスが抑制されたことを報告する（

非特許文献15)。また、Fu等は、動物モデルにFGF1又は核内移行ドメインを欠くFGF1(28-154)等を注入したところ、核内移行ドメインを欠くFGF1の方が、同ドメインを有するFGF1より、抗アポトーシス効果が増大したことを報告する(非特許文献21)。一方、Rodriguez等は、PC12細胞にFGF1発現ベクターを導入し、デキサメタゾンでFGF1を細胞内で発現させた試験で、FGF1の核内移行が認められると、神経分化、及び抗アポトーシス能が増大したと報告している(非特許文献20)。

このように、抗アポトーシス効果については、FGFRとの相互作用に関わらずFGF1が核内に移行することで生じるとの報告がある一方で、FGFRとの相互作用によりFGF1が細胞内に移行した後は、むしろ核内に移行しない方が増大するという報告もある。従って、FGF1の抗アポトーシス効果の作用機序については、明らかになっていないというのが現状である。もっとも、FGF1による抗アポトーシス効果を確認する試験でも、FGF1とFGFRとの相互作用を前提とする条件でなされるのが通常である。

[0016] FGF11サブファミリーメンバーは、FGF1及び2を含む他のFGFファミリーメンバーと異なり、FGFRと相互作用しないというユニークな特性を有する。FGF11~14がこのサブファミリーに属し、そのアミノ酸配列も知られている(特許文献1~6)。しかし、これらFGFが、どのように細胞内移行できるのか、或いは細胞内で何らかの生理作用に関与するのはよく分かっていなかった(非特許文献24)。

本発明者らは、FGF12が細胞外からFGFRに依存せずに細胞内に移行でき、その細胞内移行を担う細胞膜透過ペプチドドメイン(以下、CPPドメインと略称することがある)が、中央部(以下、CPP-Mドメインとすることがある)とC末端部(以下、CPP-Cドメインとすることがある)の2か所に存在することを報告した(非特許文献8)。この報告では、FGF11サブファミリーの他のメンバーにも類似のドメインが存在するが、FGF1にはCPP-Cドメインが存在せず、このドメインが、FGF12

の細胞内移行を促進していることを示した。この報告ではまた、FGF 12のCPP-CドメインからなるペプチドをFGF 1に融合し、得られたキメラタンパクがFGFRに依存せずに細胞内に移行できることも示した。

- [0017] 本発明らは、FGF 12自体が抗アポトーシス活性を有することも示し、更に140-181アミノ酸残基を欠くFGF 12フラグメントが、細胞内移行特性及び抗アポトーシス活性を欠くが、これにTATを付加して細胞内移行特性を回復させると、放射線誘導アポトーシスも顕著に低減することも示した（非特許文献8）。また、その後の研究で、本発明者らは、CPP-Mドメイン又はCPP-Cドメインの何れかを含むFGF 12由来の30のアミノ酸からなるペプチドが、細胞内発現により、小腸上皮細胞を増殖分化し、アポトーシスを抑制したことを報告した（非特許文献18）。

先行技術文献

特許文献

- [0018] 特許文献1：特表2000-509965
特許文献2：特表2001-507561
特許文献3：特表平11-508125
特許文献4：特表2001-505526
特許文献5：特表平11-506917
特許文献6：特表2000-517187
特許文献7：特表2003-518944
特許文献8：特表平11-507504
特許文献9：特表2003-052387

非特許文献

- [0019] 非特許文献1：Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 1996;271:15292-15297.
非特許文献2：Hagiwara A, Nakayama F, Motomura K, Asada M, Suzuki M, Imamura T, Akashi M. Comparison of expression profiles of several fibr

oblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1. *Radiat. Res.* 2009;172:58-65.

非特許文献3: Wiedlocha A, Falnes PO, Rapak A, Klingenberg O, Munoz R, Olsnes S. Translocation of cytosol of exogenous, CAAX-tagged acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 1995;270:30680-30685.

非特許文献4: Wiedlocha A, Falnes PO, Madshus IH, Sandvig K, Olsnes S. Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 1994;76:1039-1051.

非特許文献5: Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 1990;249:1567-1570.

非特許文献6: Klingenberg O, Wiedlocha A, Rapak A, Munoz R, Falnes P, Olsnes S. Inability of the acidic fibroblast growth factor mutant K132E to stimulate DNA synthesis after translocation into cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:11164-11172.

非特許文献7: Olsen SK, Garbi M, Zampieri N, Eliseenkova AV, Ornitz DM, Goldfarb M, Mohammadi M. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J. Biol. Chem.* 2003;278:34226-34236.

非特許文献8: Nakayama F, Yasuda T, Umeda S, Asada M, Imamura T, Meinke V, Akashi M. Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12. *J. Biol. Chem.* 2011;286:25823-25834.

非特許文献9: Zakrzewska M, Krowarsch D, Wiedlocha A, Olsnes S, Otłowski J. Highly stable mutants of human fibroblast growth factor-1 exhib

it prolonged biological action. *J. Mol. Biol.* 2005;352:860-875.

非特許文献10 : Zakrzewska M, Wiedlocha A, Szlachcic A, Krowarsch D, Otowski J, Olsnes S. Increased protein stability of FGF1 can compensate for its reduced affinity for heparin. *J. Biol. Chem.* 2009;284:25388-25403.

非特許文献11 : Palmen M, Daemen MJ, De Windt LJ, Willems J, Dassen WR, Heeneman S, Zimmermann R, Van Bilsen M, Doevendans PA. Fibroblast growth factor-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival after ischemia and reperfusion: a fibroblast growth factor receptor, protein kinase C, and tyrosine kinase-dependent mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;44:1113-1123.

非特許文献12 : Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visona A, Capogrossi MC, Ferreira-Maldent N, Gallino A, Wyatt MG, Wijesinghe L D, Fusari M, Stephan D, Emmerich J, Pompilio G, Vermassen F, Pham E, Grek V, Coleman M, Meyer F. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2008;16:972-978.

非特許文献13 : Mellin TN, Cashen DE, Ronan JJ, Murphy BS, DiSalvo J, Thomas KA. Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice. *J. Invest. Dermatol.* 1995;104:850-855.

非特許文献14 : Goldman SA, Siegfried J, Scoleri P, Aydogen LB, Cass SP. The effect of acidic fibroblast growth factor and live yeast cell derivative on tympanic membrane regeneration in a rat model. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1997;117:616-621.

非特許文献15 : Nakayama F, Hagiwara A, Kimura M, Akashi M, Imamura T. Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1. *Exp. Dermatol.* 2009;18:889-892.

非特許文献16 : Chen G, Gulbranson DR, Yu P, Hou Z, Thomson JA. Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012;30:623-630.

非特許文献17 : Liu Z, Neiss N, Zhou S, Henne-Bruns D, Korc M, Bachem M, Kornmann M., Identification of a fibroblast growth factor receptor 1 splice variant that inhibits pancreatic cancer cell growth, *Cancer Res.* 2007; 67:2712-2719.

非特許文献18 : 中山 文明、梅田貞子、安田武嗣、浅田真弘 鈴木理、今村亨、今井高志、第54回放射線影響学会抄録、PE-2 FGF12の小腸に対する放射線防護効果について 2011年

非特許文献19 : Fumiaki Nakayama et al., Structural Stability of Human Fibroblast Growth Factor-1 Is Essential for Protective Effects Against Radiation-Induced Intestinal Damage, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, pp.1-7, 2012.

非特許文献20 : Aida Rodriguez-Enfedaque et al., FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(2009) 1710-1727.

非特許文献21 : Xiao-Bing Fu et al., Enhanced anti-apoptosis and gut epithelium protection function of acidic fibroblast growth factor after cancelling of its mitogenic activity, *World J Gastroenterol* 2004;10(24):3590-3596.

非特許文献22 : Michael Meyer et al., FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration in vitro and in wounded skin, *Journal of Cell Science*, 2012.

非特許文献23 : 生化学、第81巻、第7号、第592頁～第596頁、2009年7月

非特許文献24 : Slur Olsnes, et al., Transport of Exogenous Growth Fact

ors and Cytokines to the Cytosol and to the Nucleus, *Physiol Rev*, Vol .83, January 2003.

非特許文献25 : Skjerpen, Camilla Skiple; Nilsen Trine, Wesche Jorgen, Olsnes Sjur, "Binding of FGF-1 variants to protein kinase CK2 correlates with mitogenicity". *EMBO J. (England)* 21 (15): 4058-69, August 2002.

非特許文献26 : Mizukoshi, E; Suzuki M, Loupatov A, Uruno T, Hayashi H, Misono T, Kaul S C, Wadhwa R, Imamura T (October 1999). "Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin". *Biochem. J. (ENGLAND)* 343 (2): 461-6.

非特許文献27 : Mouta Carreira, C; LaVallee T M, Tarantini F, Jackson A, Lathrop J T, Hampton B, Burgess W H, Maciag T (August 1998). "S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth factor-1 and p40 synaptotagmin-1 release in vitro". *J. Biol. Chem. (UNITED STATES)* 273 (35): 22224-31.

非特許文献28 : Landriscina, M; Bagala C, Mandinova A, Soldi R, Micucci I, Bellum S, Prudovsky I, Maciag T (July 2001). "Copper induces the assembly of a multiprotein aggregate implicated in the release of fibroblast growth factor 1 in response to stress". *J. Biol. Chem. (United States)* 276 (27): 25549-57.

非特許文献29 : Kolpakova, E; Wiedlocha A, Stenmark H, Klingenberg O, Falnes P O, Olsnes S (November 1998). "Cloning of an intracellular protein that binds selectively to mitogenic acidic fibroblast growth factor". *Biochem. J. (ENGLAND)* 336 (Pt 1): 213-22.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0020] 上記の通り、FGF 1 及び FGF 2 は、基本的に、FGFR との相互作用を介するシグナル伝達及び細胞内移行を通じてその生理活性を発揮するもの

と考えられ、その相互作用の相手である細胞表面の F G F R の発現レベル及び発現プロファイル等の要因によって、F G F 1 及び F G F 2 の生理活性も影響を受けることとなる。従って、F G F R の発現が元来少ないリンパ球等の血液系細胞や、熱傷、放射線、血流障害、感染などさまざまな要因により F G F 受容体の発現が低下した組織では、F G F 1 及び F G F 2 は生理作用を十分に発揮できない。

[0021] この点に関し、萩原等は、 γ 線の全身照射後にマウスの空腸での F G F R 2 b の発現レベルが一時的に低下することを報告し（非特許文献 2）、M e l l i n 等は、糖尿病性皮膚潰瘍モデルで F G F R の転写レベルが低下し、これが創傷治癒の遅れる原因であることを指摘するが（非特許文献 1 3）、いずれの報告でも、F G F R の低発現に伴う問題に対する解決策を提示していない。従って、腫瘍細胞に F G F R を強制的に発現させた以外に（非特許文献 1 7）、この問題の根本的な解決手段を提示する報告は現在のところ見当たらない。また、リンパ球、顆粒球など F G F R の発現の低い血液系細胞では、F G F 1 は効果を発揮できないが、上記の報告ではこの問題自体についても何ら触れていない。

[0022] また、腫瘍細胞の増殖や転移を、F G F R を強制的に発現させずに抑制する手段が提供できれば、従来技術に対して優位性を持つことは明らかである。また、細胞表面に F G F R が発現している場合には、F G F R を介して F G F 1 又は F G F 2 を細胞内に移行させ、F G F R を介してシグナル伝達を行うことができるため、他の経路により F G F 1 等を細胞内に移行させる必要性はないと考えられる。しかし、もし F G F R を介する F G F 1 又は F G F 2 の生理活性をより増強できる手段が提供できれば有益である。また、放射線照射や化学療法等による影響から幹細胞を保護する手段として F G F 1 又は F G F 2 を利用する報告は、現在までのところないように思われる。従って、F G F 1 又は F G F 2 によって、このような処置が可能になれば、放射線治療や化学療法による治療後における回復を促進したり、副作用を軽減する新たな選択肢を提供することができる。

課題を解決するための手段

[0023] 本発明者等は、FGF 1 2のCPP - CをFGF 1に融合させたキメラタンパク質を、FGFRを発現しない細胞と接触させて細胞内に移行させたところ、予想外にも、FGF 1の種々の生物学的又は薬理的活性が発現されることを見出した。また、本発明者等は、このようなキメラタンパク質が、FGFRの強制的な発現無しで腫瘍細胞の増殖及び転移を抑制できることを見出した。また、本発明者等は、FGFRを発現している細胞と、このキメラタンパク質を接触させたところ、予想外にも、天然のFGF 1より高い生物学的又は薬理的活性を発揮することを見出した。更には、このようなキメラタンパク質は、放射線照射や化学療法から幹細胞を防護できることを見出した。これらの知見は、FGF 1と同じサブファミリーに属するFGF 2にも同様に当て嵌まると考えられるところ、本発明は、このような知見に基づくものである。

[0024] すなわち、本発明は、その一の実施形態において、FGF 1又はFGF 2に、FGF 1 1、FGF 1 2、FGF 1 3及びFGF 1 4の何れかのCPP - Cドメインを含むCPPを融合したキメラタンパクを提供する。

また、本発明は、他の実施形態において、FGF 1又はFGF 2をコードするDNA配列と、CPP - CをコードするDNA配列とを含むDNA分子、或いはこれらのDNA配列を含むベクターを提供する。

また、本発明は、更に他の実施形態において、上記キメラタンパク質、DNA分子、又はベクターを有効成分とする、医薬用組成物を提供する。

[0025] 本発明はまた、更に他の実施の形態において、上記キメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物の治療有効量をそれを必要とする対象に投与する工程を含む、FGF 1又はFGF 2が関与する生理現象に起因する種々の疾患又は症状の予防又は治療方法を提供する。

本発明はまた、更に他の実施の形態において、上記キメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物の医薬又は細胞培養培地を調製するための使用を提供する。

[0026] 本発明による方法、医薬組成物、キメラタンパク等は、これらに限定されるものではないが、例えば、細胞の維持又は増殖のため、幹細胞の防護のため、細胞のアポトーシスを抑制するため、細胞の遊走を促進するため、腫瘍細胞の増殖又は転移を抑制するため、又は虚血性組織の機能回復のために使用することができる。より具体的には、本発明の方法、医薬組成物又はキメラタンパクは、例えば、創傷治癒の促進、放射線や化学療法による腸管の障害の予防又は治療、放射線や化学療法による脱毛症の予防又は治療、下肢虚血性疾患の治療、糖尿病性皮膚潰瘍や糖尿病性壊疽の治療、虚血性冠動脈疾患の予防及び治療、鼓膜穿孔の治療、並びに悪性腫瘍の増殖及び転移の抑制等で有効である。

[0027] 本発明で有効成分として使用されるCPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパクは、天然のFGF1又はFGF2より高い効率で細胞内に移行することができるが、この高効率での細胞内への移行は、FGFRを介さないものと考えられる。従来、FGF1又はFGF2による各種生物学的又は薬理的活性は、単にFGF1等を核内に移行させただけでは発現せず、FGFRを介したFGF1等の細胞内移行とFGFRを介するシグナル伝達が必要と考えられていたが、本発明で有効成分として使用されるCPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパクは、FGFRを介さずに細胞内に移行するにも拘らず、FGF1又はFGF2による種々の生物学的又は薬理的活性を発揮することができる。従って、本発明による医薬組成物は、治療対象となる病巣又は障害を受けた組織の細胞がFGFRの全部又は一部を発現しない又は低いレベルでしか発現しない症状又は疾患、或いは何らかの理由でFGF1又はFGF2が細胞内に移行できない症状又はFGF1等がFGFRと相互作用できない症状の治療又は予防に特に有益である。このような症状では天然のFGF1等はその生物学的又は薬理的活性を十分に発揮できないが、本発明は、この問題に対する根本的な解決手段を提供し得る。

[0028] また、本発明は、腫瘍細胞の増殖や転移を抑制する新たな手段を提供する

。腫瘍細胞は、FGFR1bの発現レベルが低く天然FGF1又はFGF2を用いる処置では、十分な治療効果が得られない。このため、これまでのFGFを用いる処置は、FGFR1bを腫瘍細胞に強制発現させた後にFGF1を投与するものであった。しかし、本発明によれば、FGFR1bを腫瘍細胞に強制発現させる必要はなく、本発明の医薬組成物を投与するだけで治療効果を得ることができる。なお、このような効能は、CPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパク質がFGFR1bに依存せずに細胞内に移行できるという作用機序に起因すると考えられるため、広範囲の腫瘍細胞の増殖や転移を抑制できると考えられる。

[0029] 本発明はまた、病巣又は障害を受けた組織の細胞がFGFRを発現している症状又は疾患に対し、従来のFGF1又はFGF2を用いる方法より効能の大きな手段を提供する。細胞表面にFGFRが発現している症状又は疾患では、FGFRを介してFGF1又はFGF2を細胞内に移行させ、FGFRを介してシグナル伝達を発生させることができるため、他の経路によりFGF1又はFGF2を細胞内に移行させる必要性はないと考えられるが、CPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパク質は、予想外にも天然のFGF1又はFGF2より高い生物学的又は薬理的活性を発揮する。

[0030] CPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパク質はまた、放射線照射や化学療法から幹細胞を防護できる作用を奏する。このため、本発明は、放射線治療や化学療法による治療後における回復を促進したり、副作用を軽減する新たな選択肢を提供する。

[0031] ここで、本明細書で用いる略称及び用語の意味をまとめて以下に示す。

FGF：線維芽細胞増殖因子（ただし、本明細書においては、後述する変異体やキメラタンパク質を含めて総称することがある）。

FGF1：線維芽細胞増殖因子1（ただし、本明細書においては、後述する変異体を含めて総称することがある）

FGF2：線維芽細胞増殖因子2（ただし、本明細書においては、後述する変異体を含めて総称することがある）

FGF 11 : 線維芽細胞増殖因子 11 (ただし、本明細書においては、後述する変異体を含めて総称することがある)

FGF 12 : 線維芽細胞増殖因子 12 (ただし、本明細書においては、後述する変異体を含めて総称することがある)

FGF 13 : 線維芽細胞増殖因子 13 (ただし、本明細書においては、後述する変異体を含めて総称することがある)

FGF 14 : 線維芽細胞増殖因子 14 (ただし、本明細書においては、後述する変異体を含めて総称することがある)

変異体 : 配列番号 1 ~ 5 に示すアミノ酸配列の何れかによって表わされる FGF 1、配列番号 6 ~ 10 に示すアミノ酸配列の何れかによって表わされる FGF 2、又は配列番号 11 ~ 29 に示すアミノ酸配列の何れかによって表わされる細胞膜透過ペプチドのアミノ酸の一部を置換若しくは削除又は 1 以上のアミノ酸を付加したタンパク質又はペプチド、或いは、既知の他の FGF 1、FGF 2 又は細胞膜透過ペプチドのアミノ酸の一部を置換若しくは削除又は 1 以上のアミノ酸を付加したタンパク質又はペプチドをいう。

CPP : 細胞膜透過ペプチド

CPP-C ドメイン : FGF 11 サブファミリーメンバーの C 末端領域に存在する細胞膜透過ペプチドドメイン

CPP-M ドメイン : FGF 11 サブファミリーメンバーの中央部に存在する細胞膜透過ペプチドドメイン

CPP-C : 特に言及しない限り、FGF 11 サブファミリー CPP-C ドメイン又はその一部のアミノ酸が置換又は欠失しているアミノ酸配列を含み且つ膜透過能を有するペプチド

CPP-FGF 1 キメラタンパク質 : CPP-C を FGF 1 に融合したキメラタンパク質

CPP-FGF 2 キメラタンパク質 : CPP-C を FGF 2 に融合したキメラタンパク質。なお、CPP-FGF 1 キメラタンパク質と CPP-FGF 2 キメラタンパク質とを総称して単にキメラタンパク質とすることがある。

FGFR：線維芽細胞増殖因子受容体

FACS：フローサイトメトリー

親水性アミノ酸：本明細書で用いる際、少なくともアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、及びリジンが含まれる。

疎水性アミノ酸：本明細書で用いる際、少なくともアラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、プロリン、及びグリシンが含まれる。

中性アミノ酸：本明細書で用いる際、少なくともアスパラギン、グルタミン、チロシン、トレオニン、及びセリンが含まれる。

図面の簡単な説明

[0032] [図1]図1Aは、本願の実施例で調製され使用されたCPP-FGF1キメラタンパク質の構造を模式的に示す概略図である。図1Bは、FGF11、FGF12、FGF13およびFGF14のCPP-Cドメイン間のアライメントを示す図である。図1B中の斜体で示すアミノ酸は、FGF12の対応するアミノ酸と異なるアミノ酸である。図1Cは、FGF11、FGF12、FGF13およびFGF14のCPP-Cドメイン間のアライメントを、アミノ酸の配列パターンを強調して示す図である。図1C中で枠で囲まれているアミノ酸は親水性又は中性アミノ酸を示し、斜体で示すアミノ酸は親水性アミノ酸を示し、下線で示すアミノ酸は中性アミノ酸を示し、その他のアミノ酸は疎水性アミノ酸を示す。

[図2]図2は、蛍光標識した各FGFを添加する前と添加した後のIEC6細胞株の蛍光強度をFACSで測定して得られたヒストグラムである。図2Aは、FGF12B及びその一部を切断した各フラグメントに関するヒストグラムであり、図2Bは、FGF1及び各CPP-FGF1キメラタンパク質に関するヒストグラムである。

[図3]図3は、IEC6細胞株を各FGFと共に培養した後でX線照射した際の細胞のアポトーシス率を示すグラフである。

[図4]図4Aは、FGF12Bの異なる領域に由来する30アミノ酸からなる

各FGF12Bフラグメントを示す。図4Bは、IEC6細胞株を各FGF12Bフラグメントと共に培養した後でX線照射した際の細胞のアポトーシス率を示すグラフである。図4Cは、蛍光標識した各FGF12Bフラグメントを添加した後のIEC6細胞株の蛍光陽性率をFACSで経時的に測定したグラフである。図4Dは、各FGF12Bフラグメント又は生理食塩水を腹腔に投与した際の各群のクリプト生存率の平均値を示すグラフである。

[図5]図5Aは、脱毛後に各FGF又は生理食塩水を腹腔内投与し、その後 γ 線を全身に照射したマウスの毛包バルブ領域を、TUNELアッセイにより免疫組織染色した顕微鏡写真(200倍)である。図5Bは、TUNELアッセイにより算出した各投与群の毛包バルブあたりのアポトーシス数の平均値を示すグラフである。

[図6]図6Aは、各FGF又は生理食塩水を腹腔内投与し、その後 γ 線を全身に照射したマウスの小腸のクリプトをTUNELアッセイにより免疫組織染色した顕微鏡写真(200倍)である。図6Bは、TUNELアッセイにより算出した各投与群のクリプトあたりのアポトーシス数の平均値を示すグラフである。

[図7]図7Aは、 γ 線を全身に照射し、その後各FGF又は生理食塩水を腹腔内投与し、照射3.5日後にBrdUを腹腔内投与したマウスの小腸の横断切片を抗BrdUにより免疫組織染色した顕微鏡写真(400倍)である。図7Bは、各投与群におけるクリプト生存率の平均値を示すグラフである。

[図8]図8Aは、 γ 線を全身に照射し、その後各FGF又は生理食塩水を腹腔内投与し、照射3.5日後にBrdUを腹腔内投与したマウスの小腸上皮組織の横断切片を抗BrdUにより免疫組織染色した顕微鏡写真(200倍)である。図8Bは各投与群におけるクリプト長さの平均値を示すグラフである。

[図9]図9は、脱毛後に各FGFを腹腔内投与し、その後 γ 線照射したマウスの毛包バルブ領域の組織を抗Keratin15抗体により免疫組織染色した顕微鏡写真(400倍)である。

[図10]図10Aは、蛍光標識した各FGFを添加する前後のヒト膵臓癌細胞株MIA PaCa-2及びPANC-1の蛍光強度をFACSで測定して得られたヒストグラムである。図10Bは、ヒト膵臓癌細胞株MIA PaCa-2及びPANC-1の細胞増殖に伴い増加するフォルマザンの吸光度（コントロールに対する吸光度差）とFGF1及びCPPF2の濃度との関係を示すグラフである。

[図11]図11Aは、FGFを無添加の培地、又は各FGFを添加した培地においてPANC-1を培養した後、メチレンブルー/メタノールで固定染色した培地の写真である。図11Bは、図11Aに示す固定染色により染色された各群のコロニー数の平均値を示すグラフである。

[図12]図12は、MIA PaCa-2をマウス大腿に皮下移植し、その後各FGF又は生理食塩水を腹腔内投与を行ったマウスにおいて、皮下の腫瘍体積の増加を経時的に示すグラフである。

[図13]図13Aは、浸潤アッセイによりゲルへ浸潤した細胞をディフクイックで固定染色したフィルターの顕微鏡写真（50倍）である。図13Bは、浸潤アッセイにより求めた各群の浸潤細胞率の平均値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0033] 本発明は、FGF1又はFGF2にFGF11サブファミリーメンバーのCPP-Cドメインを含むCPPを融合させたキメラタンパク質、FGF1又はFGF2をコードするDNA配列及びCPP-CをコードするDNA配列を含むDNA分子、或いは該DNA配列を含むベクターを有効成分とする医薬用組成物、並びに当該キメラタンパク等の医療上の使用に関する。以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0034] 1. キメラタンパク質

1-1. FGF1

FGF1は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ウマ等の哺乳動物で知られる生理活性物質であり、ヒトFGF1としては、配列番号1によって表されるアミノ酸配列を有するものがあり、マウスFGF1としては、配列番号2に

よって表されるアミノ酸配列を有するものがある。また、ラットFGF1としては、配列番号3によって表されるアミノ酸配列を有するものがあり、ウシFGF1としては、配列番号4によって表されるアミノ酸配列を有するものがあり、ウマFGF1としては、配列番号5によって表されるアミノ酸配列を有するものがある。本発明では何れの哺乳動物に由来するFGF1でキメラタンパクを構成してもよく、例えば、治療対象となる動物に応じて選択することができる。

[0035] これらのFGF1の動物間におけるアミノ酸配列の同一性は、90%以上であり、ヒトFGF1のアミノ酸配列に対する他の動物由来のFGF1のアミノ酸配列の配列同一性は、92%以上である。従って、上記アミノ酸配列の一部のアミノ酸が異なる変異体であっても、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列で構成される場合には、同様の生物学的又は薬理的活性を有するものが存在すると理解される。この観点から、配列番号1～5によって表される何れかのFGF1のアミノ酸配列に対して、好ましくは70%以上の、より好ましくは80%以上の、更に好ましくは90%以上の、特に好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列で構成される変異体であれば、変異前のFGF1と同様の生理活性を有するか、それから機能性の変異体を容易に入手できると考えられる。同様の点で、ヒトを対象とする医療用途で使用されるFGF1の変異体は、配列番号1によって表されるアミノ酸配列に対して、好ましくは70%以上の、より好ましくは80%以上の、更に好ましくは90%以上の、特に好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列で構成される。

[0036] 一方、完全FGF1のN末端領域に存在するアミノ酸配列は、FGF1の核内移行に寄与し、FGF1の細胞増殖等の生物学的又は薬理的活性の少なくとも1部については、FGF1の核内移行が必要と考えられる（非特許文献3～5）。従って、配列番号1～5によって表されるアミノ酸配列の22～28位のアミノ酸については維持することが好ましい。もっとも、このFGF1の核内移行配列は、他の起源に由来する核内移行配列に置き換える

ことが可能であり、例えば酵母ヒストン2 B由来の核移行配列 (M G K K R K S K A K) 等で置き換えることができる (非特許文献5)。また、この核内移行配列は、1～数個のアミノ酸を、同じ親水性又は疎水性のアミノ酸に置換しても核内移行活性は維持されるものと考えられる。

[0037] また、配列番号1～5のアミノ酸配列の1 2 7 L y s及び1 3 3 L y sの置換は、F G F 1のヘパリンへの結合、F G F Rの活性化又はDNA合成に影響を及ぼすと考えられるので (非特許文献6及び10)、これらの位置のアミノ酸も維持することが好ましい。もっとも、本発明のキメラタンパク質は比較的安定であり、1 2 7を置換しても所望の活性を奏することができる。

[0038] F G F 1の立体構造の安定化又は至適化に寄与することが知られているアミノ酸置換を導入してもよく、例えば、配列番号1～5に表されるアミノ酸配列の位置55のG l nをP r oに、位置62のS e rをI l eに、位置108のH i sをG l yに、位置127のL y sをA s nにそれぞれ置換することができる (非特許文献9、10及び19)。このような置換は1つのアミノ酸のみであっても又は複数のアミノ酸であってもよいが、すべての位置でこれらのアミノ酸を置換した方が安定性が向上する。もっとも、本発明で用いるキメラタンパク質は、後述する実施例で実証される通り、このようなアミノ酸置換を導入しなくとも比較的安定であり細胞内にも移行することができる。

このようなアミノ酸の置換に加え、上記で維持することが望ましいとされたアミノ酸以外については、上述した配列同一性を有する範囲で他のアミノ酸で置換してもよい。但し、置換されるアミノ酸の数は、好ましくは10個未満であり、より好ましくは8個未満であり、更に好ましくは5個未満である。

[0039] 完全F G F 1のC末端領域の全部又は一部欠けている変異体、或いは同領域の途中で他のアミノ酸配列が挿入されて同領域が分断されている変異体でもF G F 1の活性は維持されると考えられる。従って、例えば、配列番号1

～5によって表されるアミノ酸配列の152～155のFGF1C末端領域のアミノ酸の全部又は一部を欠く変異体であってもよく、このFGF1C末端領域のアミノ酸の途中に他のアミノ酸配列が挿入された変異体であってもよい。典型的な例としては、配列番号1～5によって表されるアミノ酸配列の150と151の間に、例えばCPP等の他の起源由来のアミノ酸配列が挿入されてC末端領域が分断されているFGF1変異体を挙げるができる。一方、配列番号1～5の何れかによって表される1～150のアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有することが好ましく、95%以上の配列同一性を有することがより好ましい。

[0040] なお、FGF1の一部のアミノ酸の置換及び削除については、例えば、非特許文献9、10及び19等で報告されており、本明細書では、それらの内容を参照により組み込む。

[0041] 1-2. FGF2

FGF2も、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ウマ等の哺乳動物で知られる生理活性物質であり、ヒトFGF2としては、配列番号6によって表されるアミノ酸配列を有するものがあり、マウスFGF2としては、配列番号7によって表されるアミノ酸配列を有するものがある。また、ラットFGF2としては、配列番号8によって表されるアミノ酸配列を有するものがあり、ウシFGF2としては、配列番号9によって表されるアミノ酸配列を有するものがあり、ウマFGF2としては、配列番号10によって表されるアミノ酸配列を有するものがある。本発明では何れの哺乳動物に由来するFGF2でキメラタンパクを構成してもよく、例えば、治療対象となる動物に応じて選択することができる。

[0042] これらFGF2の動物間におけるアミノ酸配列を比較すると、ヒトFGF2のN末端には、他の動物で見られない配列が存在する。一方、総ての動物間で95～99%と極めて高い配列同一性を有する領域が存在し、この共通ドメインが、FGF2の活性に関連すると考えられる。

[0043] 具体的には、配列番号6によって表されるアミノ酸配列の134～288

のアミノ酸、及び配列番号7乃至10によって表されるアミノ酸配列は、相互に95%以上の配列同一性を有し、これらのアミノ酸配列の何れかに対して80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であれば、配列番号6～10の何れかによって表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換若しくは欠失し、又は他のアミノ酸が付加されてもFGF2活性を奏すると考えられる。

[0044] また、FGF1と同様に、完全FGF2のC末端領域の全部又は一部欠けている変異体、或いは同領域の途中で他のアミノ酸配列が挿入されて同領域が分断されている変異体でもFGF2の活性は維持され则认为られる。例えば、配列番号6によって表されるアミノ酸配列の283～288のアミノ酸、配列番号7～9によって表されるアミノ酸配列の149～154のアミノ酸、又は配列番号10によって表されるアミノ酸配列の150～155のアミノ酸の全部又は一部を欠く変異体であってもよく、このFGF1C末端領域のアミノ酸の途中で他のアミノ酸配列が挿入された変異体であってもよい。典型的な例としては、配列番号6によって表されるアミノ酸配列の282と283の間、配列番号7～9によって表されるアミノ酸配列の148と149の間、又は配列番号10によって表されるアミノ酸配列の149と150の間に、例えばCPP等の他の起源由来のアミノ酸配列が挿入されてC末端領域が分断されているFGF2変異体を挙げることができる。

[0045] なお、これらFGF2における共通ドメインをFGF1（配列番号1～5の1～155のアミノ酸）と比較すると、53～55%の配列同一性を有する。

[0046] 1-3. CPP

本発明で有効成分として使用されるキメラタンパクは、FGF1又はFGF2にFGF1サブファミリーCPP-Cドメインを含むCPP（CPP-C）を融合した構造を有する。CPPをFGF1等に融合させたキメラタンパク質としては、ジフテリア毒素AをFGF1に融合させたキメラタンパクが知られているが、このキメラタンパク質を投与してFGF1を細胞内に

移行させてもDNAの合成に止まり、細胞分裂及び増殖にはFGFRの関与が必要であると理解されていたところ（非特許文献4及び24）、FGF1にCPP-Cを融合させたキメラタンパク質では、FGF1が種々の生理活性を発揮した。

[0047] CPP-Cは、ヒト、マウス、ラット、ウシ及びウマ等の哺乳動物から得ることができ、キメラタンパク質の投与対象又は使用目的等に応じて適宜選択することができる。

例えば、ヒトFGF11乃至14のCPP-Cドメインは、それぞれ、配列番号11、12、13及び14に示すアミノ酸配列で表わされる。マウスFGF11乃至14のCPP-Cドメインは、それぞれ、配列番号15、16、17及び18によって表されるアミノ酸配列で表わされる。また、ラットFGF11乃至14のCPP-Cドメインは、それぞれ、配列番号19、20、21、及び22に示すアミノ酸配列で表わされ、ウシFGF11乃至14のCPP-Cドメインは、それぞれ、配列番号23、24、25、及び26に示すアミノ酸配列で表わされ、ウマFGF11、FGF13及び14のCPP-Cドメインは、それぞれ、配列番号27、28、及び29に示すアミノ酸配列で表わされる。

[0048] FGF11サブファミリーCPP-Cドメインの動物間での配列同一性は、FGF11で80~100%、FGF12で100%、FGF13で100%、FGF14で100%である。また、例えば、ヒトでのFGF11サブファミリーCPP-Cドメイン間での配列の異同は、図1Bに示す通りであり、60から80%の配列同一性を有し、2~4個のアミノ酸が相互に異なる。一方、図1Cに示すように、例えば、ヒトでのFGF11サブファミリー間では、親水性アミノ酸又は中性アミノ酸と疎水性アミノ酸との配列パターンが共通し、CPP-Cドメインを構成するアミノ酸配列のN末端側から3番目及び9番目のアミノ酸は親水性で、7番目のアミノ酸は中性で、8番目は親水性又は中性で、その他の部位はすべて疎水性となっている。

[0049] 従って、配列番号11~29の何れかによって表わされるCPP-Cドメ

ンインと親水性アミノ酸又は中性アミノ酸と疎水性アミノ酸との配列パターン、好ましくは親水性アミノ酸、中性アミノ酸及び疎水性アミノ酸の配列パターンが共通し、且つ60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の配列同一性を有するFGF11サブファミリーCPP-Cの変異体であれば、キメラタンパク質の細胞内移行を可能にすると考えられる。もっとも、極性がより近いアミノ酸間で置換することが好ましく、例えば以下に示すアミノ酸で構成されるCPP-Cドメインを含むペプチドが好ましい。

- 1番目： プロリン、又はロイシン（好ましくは、プロリン）
- 2番目： イソロイシン、又はロイシン（好ましくは、ロイシン）
- 3番目： グルタミン酸、又はリジン（好ましくは、グルタミン酸）
- 4番目： バリン
- 5番目： システイン、又はアラニン（好ましくは、アラニン）
- 6番目： メチオニン、又はバリン（好ましくは、メチオニン）
- 7番目： チロシン
- 8番目： アルギニン、リジン、又はグルタミン（好ましくは、アルギニン）
- 9番目： グルタミン酸
- 10番目： プロリン

[0050] キメラタンパク質を構成するCPPは、CPP-Cドメインを構成するアミノ酸配列の両端又はその一方に更に1以上のアミノ酸が付加されたものでもよく、例えば、10より多く、40以下のアミノ酸からなるCPP-Cとすることができる。また、例えば、全体が各種哺乳動物のFGF11~14の何れかに由来するCPP-Cであって、連続する10より多いアミノ酸からなるCPP-Cとすることができる。もっとも、このような追加のアミノ酸は少ない程細胞膜透過効果大きい。従って、追加のアミノ酸を含むCPP-Cは、好ましくは40以下、より好ましくは25以下、更に好ましくは20以下、より更に好ましくは15以下のアミノ酸残基で構成され、特に好

ましくはCPP-Cドメインのみで構成される。同様の観点から、全体がヒトFGF11～14に由来するCPP-Cとする場合には、配列番号11～14の何れかで表されるアミノ酸配列を含み、且つ好ましくは連続する40以下のアミノ酸、より好ましくは連続する25以下のアミノ酸、更に好ましくは連続する20以下のアミノ酸、より更に好ましくは連続する15以下のアミノ酸で構成され、特に好ましくは配列番号11～14の何れかで表されるアミノ酸配列のみで構成される。勿論、CPPを構成するアミノ酸配列は、上述したような、CPP-Cドメインの疎水性アミノ酸又は中性アミノ酸と、親水性アミノ酸との配列パターンを維持しながら一部の、好ましくは数個以内のアミノ酸が置換されていてもよい。

[0051] なお、FGF11サブファミリーメンバー由来のCPPについては、非特許文献8に詳細に記載されており、本明細書では、それらの内容を参照により組み込む。

[0052] 1-4. CPPのFGF1との結合

本発明によるキメラタンパクは、FGF1又はFGF2に、CPP-Cが融合されているものであるが、両者は、直接結合してもよく、ペプチドからなる連結部分を介して結合してもよい。ペプチドからなる連結部分としては、アスパラギン酸やグルタミン酸等の親水性アミノ酸で構成することが好ましい。また、立体構造の点から、10個未満のアミノ酸からなる連結部分が好ましく、3個未満のアミノ酸からなる連結部分より好ましい。

[0053] CPP-Cは、他のペプチドを連結させない場合には、FGF1のN末端側に結合させることができるが、通常は、C末端側に結合されるか、C末端領域のアミノ酸配列の途中に挿入される。より具体的には、例えば、配列番号1～5に示すアミノ酸配列の151～155の任意の位置でC末端側を切断して得られたFGF1変異体、或いは完全FGF1又はC末端領域が完全に維持されているFGF1変異体のC末端に連結部分を介して又は介さずにCPPを結合することができる。また、例えば、配列番号1～5に示すアミノ酸配列の151～155の任意の位置に、CPP-Cを1つ又は2つの連

結部分を介して又は介さずに挿入することができる。

[0054] 同様に、配列番号6によって表されるアミノ酸配列の283～288のアミノ酸、配列番号7～9によって表されるアミノ酸配列の149～154のアミノ酸、又は配列番号10によって表されるアミノ酸配列の150～155のアミノ酸の任意の位置でC末端側を切断して得られたFGF2変異体、或いは完全FGF2又はC末端領域が完全に維持されているFGF2変異体のC末端に連結部分を介して又は介さずにCPPを結合することができる。また、例えば、配列番号6によって表されるアミノ酸配列の283～288のアミノ酸、配列番号7～9によって表されるアミノ酸配列の149～154のアミノ酸、又は配列番号10によって表されるアミノ酸配列の150～155のアミノ酸の任意の位置に、CPP-Cを1つ又は2つの連結部分を介して又は介さずに挿入することができる。

[0055] このような構成は、元のFGF1又はFGF2のアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列としながらCPP-Cを導入することができるため、FGF1又はFGF2の本来の機能を維持する点で好ましい。

[0056] 図1Aは、本発明の好適な実施形態によるCPP-FGF1キメラタンパク質の構造を模式的に示す。この実施形態では、FGF1のアミノ酸配列は、150と151の間で分断されており、FGF1サブファミリーメンバーのCPP-Cが、EcoRI切断配列及びSalI切断配列を介してその位置に挿入されている。この実施形態では、CPP-Cは、CPP-Cドメインを構成する10個のアミノ酸のみで構成され、FGF1の1～150のアミノ酸配列は維持されている。従って、細胞膜透過能が高く、FGF1の生物学的又は薬理的活性が完全に維持されているものと考えられる。実際、後述する実施例で実証する通り、様々な薬理作用を高レベルで発揮することができる。このようなキメラタンパク質の具体的なアミノ酸配列を配列番号30～33に示す。

[0057] 1-5. キメラタンパク質の調製方法

上述したCPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパク質の調製

方法の例を以下に示す。

[0058] FGF 1 又は FGF 2 をコードする DNA を合成又はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等で複製する。この DNA の適当な部位に制限酵素切断部位を付加し、制限酵素で切断しておく。

[0059] 一方、CPP をコードし、対応する制限酵素切断末端をも有する 1 本鎖 DNA 断片を合成し、アニーリングにて 2 本鎖にする。その後、DNA リガーゼを用いて FGF 1 又は FGF 2 をコードする DNA の切断部位に CPP をコードする DNA 断片を挿入、結合させる。制限酵素としては 1 種類又は 2 種類を用いることができる。

このキメラタンパク質をコードする DNA を組み込むベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば、いずれのベクターも使用できる。例えば、大腸菌由来のプラスミド (pBR322、pBR325、pUC12、pET-3)、枯草菌由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージやその誘導体、レトロウイルス、アデノウイルスやワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、昆虫ウイルスなどの発現ベクターが挙げられる。

[0060] キメラタンパク質の遺伝子は、その 5' 末端に翻訳開始コドンとして ATG を有してもよく、3' 末端に翻訳終始コドンとして TAA、TGA、又は ATG を有してもよい。また、これら発現ベクターでは、CPP-FGF キメラタンパク質のコード配列の上流にプロモーターを設け、その遺伝子を宿主で発現可能とすることが好ましい。プロモーターは、遺伝子の発現に用いる宿主にとって適切なものならば、いかなるものでもよい。

宿主としては、大腸菌 (例えば、BL21、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、BL21 (DE3) pLysE)、枯草菌 (例えば、*Bacillus subtilis* DB305)、酵母 (例えば *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*)、動物細胞 (例えば COS cell, CHO cell, BHK cell, NIH3T2 cell, HUVE cell, LE11 cell)、昆虫細胞などが挙げられる。

- [0061] 形質転換は、それぞれの宿主に応じて適用可能な方法を選択すればよく、例えば、大腸菌が宿主の場合は、カルシウム法やその他の方法で作成したコンピータント細胞に、温度ショック法やエレクトロポレーション法にて組み換えDNA又はベクターを導入できる。
- [0062] このようにして、CPP-FGF1キメラタンパク質をコードする組み換えDNAを含むベクターを保持する形質転換体を得られ、この形質転換体を培養することで、CPP-FGF1キメラタンパク質が産生される。形質転換体の培養には、宿主に応じて適切な培地を選択すればよく、例えば、大腸菌が宿主の場合、LB培地を用い、酵母の場合はYPD培地などを用いる。培養条件も、それぞれの宿主に応じて適宜適切な条件を選択すればよく、例えば、大腸菌が宿主の場合は、約30～37℃で約3～24時間培養を行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることができる。
- [0063] 培養後、培養菌体若しくは培養細胞を破壊して、キメラタンパク質を溶出させる方法としては、例えば、ホモジナイザー、フレンチプレス、超音波、リゾチーム、凍結融解などがある。キメラタンパク質の精製は、可溶性分画から既知の分離法及び精製法を単独又は組み合わせて行うことができる。そのような分離法又は精製法としては、塩析、溶媒沈殿、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、及び等電点電気泳動などを挙げることができる。好適な一例として、キメラタンパク質のFGF1部分にヘパリン結合ドメインが保存されている場合に、そのヘパリン結合性を利用して単離する方法を挙げることができる。具体的には、例えば、ヘパリンセファロースクロマトグラフィにキメラタンパク質を吸着させ、塩化ナトリウムのグラジエントを用いて溶出させることで分離・精製できる。
- [0064] 以上のように得られたキメラタンパク質は、通常、4℃以下で冷蔵若しくは冷凍保存することが好ましい。また、活性が失われない限りにおいて透析を行い適当な溶媒に置換も可能である。さらに、凍結乾燥を行い乾燥粉末と

することもできる。

[0065] 2. 組換えDNA又はベクター

本発明では、上述したキメラタンパク質をコードする組換えDNA又はそのような組換えDNAを有するベクターを有効成分として使用することもできる。この実施の形態では、例えば、このような組換えDNA又はベクターを用いて上述したキメラタンパク質を体内で発現させて目的の治療を行うこともできる。

[0066] 組換えDNAとしては、配列番号1～5の何れかで表されるFGF1又は配列番号6～10の何れかで表されるFGF2のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対して、少なくとも60%、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の配列同一性を有するDNA配列と、配列番号11～29の何れかで表されるFGF11サブファミリー-CPP-Cドメイン又はこれと疎水性アミノ酸又は中性アミノ酸と親水性アミノ酸との配列パターンが同じアミノ酸配列をコードするDNA配列とを含む組み換えDNAを典型例として挙げるができる。

[0067] ベクターとしては、遺伝子治療用に一般的に用いられているものでよく、例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、センダイウイルス、プラスミド等が挙げられ、目的に応じて好適なものを選択することができる。特に、センダイウイルスが好ましい。

また、本発明によるキメラDNAを生体に導入し発現する方法としては、例えば、膜融合リポソーム、ナノ粒子等がある。

[0068] 3. キメラタンパクの医薬用途

本発明によるCPP-FGF1キメラタンパク質は、FGF1を主要な構成部分とするため、天然のFGF1で予防若しくは治療可能な症状又は疾患に有効である。従って、発生期だけでなく成人において脳、中枢神経、腎臓、胎盤、副腎、皮膚、毛髪、鼓膜、眼、腸管などの消化管などさまざまな組織での細胞分裂、細胞増殖、抗アポトーシス、幹細胞の防護、血管新生等の生理作用が関与する種々の医学的用途に有効である。例えば、本発明のキメ

ラタンパク質は、これらに限定されるものではないが、放射線、化学療法、物理的介入、アポトーシス又はその他の原因による、脳、中枢神経、腎臓、胎盤、副腎、皮膚、毛髪、鼓膜、眼、腸管等の消化管、卵巣等の生殖組織などの組織の脱落、変性、潰瘍、壊死、損傷又は障害、或いは下肢虚血性疾患又は虚血性冠動脈疾患等の虚血性症状又は疾患、或いは肺癌、胃癌、大腸癌、膵癌、腎細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫、子宮体癌、卵巣癌、膀胱癌、尿管癌、血管肉腫等の腫瘍細胞の増殖又は転移等の予防又は治療に有効である。

[0069] 本発明によるCPP-FGF1又はCPP-FGF2キメラタンパク質は、FGFRに依存せずに細胞内に移行しFGF1又はFGF2による生物学的又は薬理的活性を発揮することができる。このため、本発明のキメラタンパク質は、特に、FGFRの発現が元来少ないリンパ球等血液系細胞や、熱傷、放射線、血流障害、感染などさまざまな要因によりFGFRの発現が低下した組織、FGFRの発現プロファイルが正常組織と異なる腫瘍、或いは何らかの原因でFGF1若しくはFGF2が細胞内に移行できない又はFGFRと相互作用できない症状の予防又は治療に有効である。このような症状又は疾患では、FGFRの低発現等が障害になり天然のFGF1等の投与では十分な予防又は治療効果が得られなかったため、本発明の組成物は、このような症状又は疾患に対し、より高い予防又は治療効果をもたらすことができる。このような疾患又は症状の例としては、例えば、熱傷による皮膚組織の障害、放射線若しくは化学療法による腸管等の組織の障害、放射線若しくは化学療法による脱毛症等の放射線等によって誘導されるアポトーシスに起因する組織の脱落、下肢虚血性疾患若しくは虚血性冠動脈疾患等の虚血性症状又は疾患、糖尿病性皮膚潰瘍若しくは糖尿病性壊疽、或いは肺癌、胃癌、大腸癌、膵癌、腎細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫、子宮体癌、卵巣癌、膀胱癌、尿管癌、血管肉腫等の腫瘍細胞の増殖又は転移等の予防又は治療等がある。

[0070] 本発明によるキメラタンパク質等を含む医薬組成物は、その他の成分につ

いては特に制限はなく、例えば、医薬的に許容できる溶剤、希釈剤、賦形剤、担体、補助剤などを使用し、製剤製造の常法に従って、液剤、注射剤、散剤、顆粒剤、錠剤、坐剤、軟膏、腸溶剤又はカプセル剤などの剤型に調製することができる。本発明による医薬組成物は、投与ルートについても特に制限はなく、適応症や剤型等に応じて経口的に又は血管内、皮下、腹腔内、腫瘍内等の非経口的により投与することができる。本発明による医薬組成物の投与量は、剤型、投与ルート、及び症状により適宜変更されるが、例えばヒトを含む哺乳類に、経静脈的に投与する場合は、キメラタンパク質を1日あたり、0.001~1mg/体重kg程度とすることが好ましく、皮下注射により投与する場合は、キメラタンパク質を1日あたり、0.01~10mg/体重kg程度とすることが好ましい。

[0071] また、本発明の医薬組成物は、CPP-FGF1キメラタンパク質以外に、活性成分を含んでもよく、そのような追加の活性成分としては、例えば、G-CSF等のサイトカインやVEGF、HGF、EGF等の他の細胞増殖因子、あるいはそれらを標的とする分子標的薬等を挙げることができる。

このような併用される活性成分は、適応症に応じて選択され、例えば、腫瘍の治療の場合には、分子標的薬等を組み合わせることができ、放射線障害の予防又は治療においては、サイトカインや増殖因子等を組み合わせることができる。

実施例

[0072] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

[0073] 試験方法及び試験材料

各実施例で利用した試験方法及び材料をここでまとめて示す。

1. FGF1、FGF12B及びFGF12Bフラグメント

配列番号1に示すアミノ酸配列を有するFGF1を非特許文献8に記載する方法に従って、調製した。FGF12B及びFGF12Bフラグメントも非特許文献8に記載する手順で調製した。FGF12Bのアミノ酸配列を配

列番号34に示す。

2. キメラタンパク質

FGF11サブファミリーであるFGF11、FGF12、FGF13及びFGF14に由来する各CPP-CをFGF1に融合したキメラタンパク質（以下、それぞれCPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4と略称する）を、非特許文献8に記載する方法に従って調製した。非特許文献8の関連記載を参照によりここに組み込む。

各キメラタンパク質の構造を図1Aに示し、キメラタンパク質のアミノ酸配列を配列番号30～33に示す。

3. FACS

非特許文献8に記載する方法に従って、各FGFを蛍光標識し、FACS Calibur（BDバイオサイエンス社製）にて蛍光強度を測定した。

4. TUNELアッセイ

非特許文献8に記載する方法に従って、マウス組織のパラフィン包埋切片よりアポトーシスを検出した。

5. 実験マウス

各実施例でのマウスの処理は、放射線医学総合研究所動物実験委員会により事前に承認された動物実験計画に記載する動物倫理に基づき行われた。

[0074] 細胞内移行能の評価1

この試験では、FGFRの発現が低い細胞に対するCPP-FGF1キメラタンパク質の細胞内移行能を評価した。

[0075] この試験では、試験細胞として、ラット小腸細胞株IEC6を用い、24ウェルプレートにウェル当り 1×10^5 個播種した。各ウェルに5%FCS及び $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ インスリンを含有するDMEM培地を加え、6時間培養してプレートに細胞を付着させた。その後、蛍光ラベルしたFGF12B、C末端を10残基ずつ追加的に削った各FGF12Bフラグメント（ $\Delta 170-181$ 、 $\Delta 160-181$ 、 $\Delta 150-181$ 、及び $\Delta 140-181$ ）、FGF1、CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4をそれぞれ

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにプレートに添加し、24時間培養後、トリプシンにて細胞をプレートより剥がし、FACSでその蛍光強度を測定して、細胞内に移行したFGFの量を測定した。

[0076] 図2Aは、FGF12B又は各FGF12Bフラグメントの添加前後のFACSヒストグラムを示し、図2Bは、FGF1又は各CPP-FGF1キメラ蛋白質の添加前後のFACSヒストグラムを示す。点線が各FGFを添加前の細胞のFACSヒストグラムであり、実線が各FGFを添加した後の細胞のFACSヒストグラムである。

[0077] 図2Aに示す通り、FGF12Bで培養した細胞は、実線の細胞集団の右への移動が大きく、細胞の蛍光強度が強いことが分る。FGF12BのC末端から10残基ずつ欠損させても、アミノ酸残基1-149を維持しているFGF12Bフラグメント ($\Delta 170-181$ 、 $\Delta 160-181$ 、及び $\Delta 150-181$) では蛍光強度が殆ど変わらず強いままであった。但し、この中では最も短いアミノ酸残基150-181を切断したフラグメントで蛍光強度が最大となった。一方、アミノ酸残基140-181を切断したフラグメントでは蛍光強度が急激に弱まった。これらの結果から、FGF12Bのアミノ酸残基140-149が、CPP-Cドメインであることが推認され、その一方で、このCPP-Cドメインの前後にアミノ酸が付加されても細胞内移行能が保持されることが示された。また、CPP-Cドメインの前後に付加されるアミノ酸の数は、少ない方がより高い細胞内移行能を奏することも推察された。

[0078] 図2Bに示す通り、FGF1で培養した細胞は、実線の細胞集団の右への移動が少なく、細胞の蛍光強度が弱いことが分る。一方、各キメラタンパク質 (CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4) と共に培養した細胞ではFGF1と比較して実線の細胞集団の右への移動が大きく、細胞の蛍光強度が強いことが分る。4種のキメラタンパク質間では蛍光強度はほぼ同等であった。この結果から、FGF1と比較して、CPP-FGF1キメラタンパク質の方が、効率よく細胞内へ移行できることが実証された。

[0079] アポトーシス抑制効果に関する評価1

この試験では、放射線により誘発される細胞のアポトーシスに対するCPP-FGF1キメラタンパク質の抑制効果を評価した。

[0080] この試験でも、試験細胞としてFGFRを発現していないラット小腸細胞株IEC6を用い、この細胞を、各3.5cmディッシュに 3×10^4 個まき、各ディッシュに5% FCS及び $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ インスリンを含有するDMEM培地を加えた。各ディッシュを、 37°C 、5% CO_2 の雰囲気インキュベータに入れ、16時間培養した。次いで、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でヘパリンを各培地に加え、コントロール群では、FGFを添加せず、各試験群ではそれぞれFGF1、CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4を $100 \text{ ng}/\text{ml}$ となる濃度で添加し、さらに24時間培養後、X線を 20 Gy 照射した。照射24時間後に細胞を2%グルタルアルデヒドで固定し、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258にて核染色を行い、倒立蛍光顕微鏡で1視野200細胞以上を10視野鏡検し、核凝縮を伴う細胞数を算出した。この核凝集細胞をX線照射によりアポトーシスを誘発された細胞とみなし、各視野で鏡検した全細胞数に対する核凝集細胞数の割合を、アポトーシス率として評価した。

[0081] 図3は、コントロール群及び各試験群のアポトーシス率の平均値 \pm 標準偏差(S.D.)を表す。図中**は、コントロール群に対する多重検定により $P < 0.01$ となった試験群を示し、***は同検定で $P < 0.001$ となった試験群を示す。

[0082] FGFを含まないコントロール群では、アポトーシス率は約45%に達した。また、FGF1を添加した試験群でもコントロール群に対して有意なアポトーシス率の減少は認められなかった。一方、CPP-FGF1キメラタンパク質(CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4)を添加した試験群では、何れも、コントロール群に対して有意にアポトーシス率が減少した。これにより、FGF1は、FGFRを発現していない細胞のアポトーシスを効果的に抑制し得ないが、CPP-FGF1キメラタンパク質は、

そのような細胞であってもアポトーシスを抑制することができることが実証された。本来、FGFRを介してアポトーシスを抑制することが期待されるFGF1が、コントロールに対して有意差を示さなかったことは、IEC6細胞にFGFRの発現が確認されていないことと整合的である。一方、このような条件でも、CPP-FGF1キメラ蛋白質がアポトーシスを抑制できることは、CPP-FGF1キメラ蛋白質がFGFRの発現に依存せず細胞内へ移行できる特性に起因する可能性が高い。

[0083] アポトーシス抑制効果に関する評価2

この試験では、放射線により誘発される細胞のアポトーシスに対するFGF12B及びFGF12フラグメントの抑制効果を評価した。

[0084] この試験では、図4Aに示すFGF12B及び各FGF12フラグメントをFGFとして用いた。P8のフラグメントはCPP-Mを含み、P11及びP12のフラグメントはCPP-Cを含んでいる。試験細胞としては、この試験でもラット小腸細胞株IEC6を用いた。

試験手順は、上述のアポトーシス抑制効果に関する評価と同様である。図4Bは、コントロール群及び各試験群のアポトーシス率の平均値+/-標準偏差(S.D.)を表す。図中*は、コントロール群に対する多重検定により $P < 0.05$ となった試験群を示し、***は同検定で $P < 0.001$ となった試験群を示す。

[0085] ペプチドを含まないコントロール群では、アポトーシス率は約45%に達した。また、P8、P10、及びP12を添加した試験群では、何れも、コントロール群に対して有意にアポトーシス率が減少した。一方、やはりCPP-Cを含んでいるP11を添加した試験群では、コントロール群に対して有意にアポトーシス率が減少しなかった。これにより、CPP-Cを含む30アミノ酸からなるP12はアポトーシスを抑制するが、10アミノ酸からなるCPP-C自身はアポトーシスを抑制できないことが実証された。さらに、中央部のCPP-Mドメインを含むペプチドも、アポトーシスを抑制することが実証された。

[0086] 図4Cは、FGF12BのC末端ペプチドの細胞内移行能を示す。蛍光標識した各ペプチドを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となる濃度で添加後のIEC6細胞株の蛍光陽性率をFACSで経時的に測定したグラフである。24時間をピークにCPP-Cを含むP12は細胞内に移行した。同じくCPP-Cを含むP11は、P12よりも蛍光陽性率が低いものの、P12と同様に24時間をピークに細胞内に移行した。一方、P10とP13は24時間後では蛍光陽性率は極めて低かった。

[0087] 図4Dは、ペプチド又は生理食塩水腹腔投与群におけるクリプト生存率の平均値を示すグラフである。8週齢のオスBALB/cマウスを使用し、コントロール群では、 0.5ml の5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、それぞれ $100\mu\text{g}$ のP8、P10、P12を、 0.5ml の5%マウス血清入り生理食塩水で希釈して、マウスの腹腔に投与した。その24時間後に 10Gy のガンマ線を $0.5\text{Gy}/\text{min}$ の線量率で各群のマウスに全身照射した。照射3.5日後にマウスを安楽死させ、空腸を採取した。10%ホルマリンで空腸を固定した後、パラフィン包埋切片を作成し、HEで切片を染色した。顕微鏡により10以上のクリプト細胞が存在するクリプトを生存と判断して10個の腸横断面について横断面あたりのクリプト数を数え、その平均値を算出した。さらに、この平均値を、放射線非照射群の横断面あたりのクリプト数の平均値で割って相対値（クリプト生存率）を求めた。各群における3個体のマウスのクリプト生存率の平均値 \pm 標準偏差（S. D.）を示した。

[0088] P8またはP12を投与した群では、空腸のクリプト生存率は、コントロール群に対しても有意に高かったが、P10を投与した群では空腸のクリプト生存率はコントロール群に対して有意に高くならなかった。

[0089] 毛包障害予防効果に関する評価

この試験では、放射線による脱毛・毛包障害に対するCPP-FGF1キメラタンパク質の予防効果を評価した。毛包は、成長期において細胞分裂を活発に行っており、この時期では放射線に対して高い感受性を有する。この

ため、この時期の毛包に放射線を照射するとアポトーシスが引き起こされ易いが、このアポトーシスは毛包障害の指標となる。

そこで、成長期のマウス毛包において放射線誘導性アポトーシスに対するCPPF-FGF1キメラタンパク質の抑制効果を測定して、毛包障害予防効果を評価した。

[0090] 生後51-53日齢のオスBALB/cマウスの背部より抜毛を行い、休止期である毛包を成長期へと誘導した。抜毛後5日目に、コントロール群では、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、それぞれ100 μ gのFGF1、FGF12、CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4を、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水で希釈して、マウスの腹腔に投与した。24時間後、12Gyのガンマ線を0.5Gy/minの線量率で全身照射した。照射24時間後にマウスを安楽死させ、皮膚を採取し、10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋切片を作成し、TUNELアッセイを実施した。TUNEL陽性細胞をアポトーシス細胞とみなし、3視野以上において毛包バルブ毎のアポトーシス数を算定した。

[0091] 図5Aは、各群のマウスの毛包バルブ領域を、TUNELアッセイにより免疫組織染色した顕微鏡写真(200倍)であり、図中の矢印は、TUNEL陽性細胞(すなわち、アポトーシス細胞)を示す。図5Bは、各群における3視野以上の毛包バルブあたりのアポトーシス数の平均値 \pm 標準偏差(S.D.)を示し、図中の***は、5%マウス血清入り生理食塩水を投与したコントロール群に対する多重検定により $P < 0.001$ となった試験群を示す。

コントロール群では、12Gyの全身ガンマ線照射により、毛包バルブ領域にアポトーシスを示すTUNEL陽性細胞を、毛包バルブあたり約11個検出した。FGF1投与群及びFGF12投与群では、コントロール群に対して毛包バルブあたりのTUNEL陽性細胞数が有意に減少した。また、CPPF-FGF1キメラタンパク質(CPPF1、CPPF2、CPPF3及

びCPPF4)を投与した群では、いずれも、コントロール群に対してのみならずFGF1投与群($P < 0.001$)及びFGF12投与群($P < 0.05$)に対しても有意に毛包バルブあたりのTUNEL陽性細胞数が減少した。これにより、CPP-FGF1キメラタンパク質が、FGF1やFGF12より、脱毛・毛包障害に対するより高い予防効果を示すことが実証された。

[0092] 放射線による小腸の障害に対する予防効果

本試験では、放射線による小腸の障害に対するCPP-FGF1キメラタンパク質の予防効果を評価した。放射線の被ばくにより障害を受けた小腸上皮の回復過程では、幹細胞が存在するクリプトが非常に重要な役割を担う。従って、放射線による障害の程度は、クリプトに存在するアポトーシス数と相関する。そこで、放射線を照射されたマウスのクリプトにおけるアポトーシス数を測定して、放射線による小腸の障害に対するCPP-FGF1の予防効果を評価した。

[0093] 8週齢のオスBALB/cマウスを使用し、コントロール群では、0.5 mlの5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、それぞれ100 μ gのFGF1、FGF12、CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4を、0.5 mlの5%マウス血清入り生理食塩水で希釈して、マウスの腹腔に投与した。24時間後、12 Gyのガンマ線を0.5 Gy/minの線量率で各マウスに全身照射した。照射24時間後にマウスを安楽死させ、小腸を採取し、10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋切片を作成し、TUNELアッセイを実施した。TUNEL陽性細胞をアポトーシス細胞とみなし、10視野でクリプト毎のアポトーシス数を算定した。

[0094] 図6Aは、各群のマウスにおける小腸のクリプトをTUNELアッセイにより免疫組織染色した顕微鏡写真であり、図中の矢印は、TUNEL陽性細胞(すなわちアポトーシス細胞)を示す。図6Bは、各群における10視野のクリプトあたりのTUNEL陽性細胞数の平均値+/-標準偏差(S.D

。)を示し、図中の***は、5%マウス血清入り生理食塩水を投与したコントロール群に対する多重検定より $P < 0.001$ となった試験群を示す。

[0095] 図6Bに示す通り、コントロール群では、12 Gyの全身ガンマ線照射により、各クリプトにアポトーシス数が平均4.41個検出された。しかし、FGF1投与群では、アポトーシス数が平均3.61個と有意に減少し($P < 0.001$)、FGF12投与群でも、アポトーシス数が平均2.18個と有意に減少した($P < 0.001$)。各CPP-FGF1キメラタンパク質(CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4)を投与した群では、それぞれ平均1.50個、1.63個、1.58個、及び1.51個とアポトーシス数が著しく減少した。コントロール群と比較したアポトーシス減少率は、FGF1投与群では18.1%に過ぎなかったが、CPPF1投与群では66%、CPPF2投与群では63.1%、CPPF3投与群では64.2%、CPPF4投与群では65.8%と、60%以上に達し、これらのCPP-FGF1投与群はFGF1投与群に対しても有意にアポトーシスを減少させた($P < 0.001$)。また、コントロール群に対するFGF12投与群のアポトーシス減少率は、50.5%であり、FGF12群に対しても有意にアポトーシスを減少させた。

これにより、CPP-FGFキメラタンパクが、FGF1やFGF12と比較して、放射線による小腸の障害に対する保護効果が高いことが実証された。

[0096] 障害を受けた小腸の回復促進効果に関する評価1

この試験では、放射線照射後に再生したクリプト数を指標にして、CPP-FGF1キメラタンパク質の放射線による障害を受けた小腸の回復を促進させる効果を評価した。

[0097] 8週齢のオスBALB/cマウスを使用し、最初に10 Gyのガンマ線を0.5 Gy/minの線量率で各群のマウスに全身照射した。その24時間後に、コントロール群では、0.5 mlの5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、それぞれ10 µgのFGF1、CPP

F 1、CPPF 2、CPPF 3及びCPPF 4を、0.5 mlの5%マウス血清入り生理食塩水で希釈して、マウスの腹腔に投与した。照射3.5日後にBrdUラベリング液を腹腔注射し、細胞分裂している細胞にBrdUを取り込ませ、2時間後にマウスを安楽死させ、空腸を採取した。10%ホルマリンで空腸を固定した後、パラフィン包埋切片を作成し、この切片を、抗BrdU抗体により免疫組織染色し、次いでヘマトキシリン染色した。

[0098] 図7Aは、BrdUを取り込み抗BrdU抗体が結合した細胞を有するクリプトを示す腸横断面の顕微鏡写真である。顕微鏡により10以上の抗BrdU抗体陽性細胞が存在するクリプトを生存と判断して10個の腸横断面について横断面あたりのクリプト数を数え、その平均値を算出した。さらに、この平均値を、放射線非照射群の横断面あたりのクリプト数の平均値で割って相対値（クリプト生存率）を求めた。図7Bは、各群における3個体のマウスのクリプト生存率の平均値 \pm 標準偏差（S. D.）を示し、図中の**は、5%マウス血清入り生理食塩水を投与したコントロール群に対する多重検定により、 $P < 0.01$ となった試験群を示し、***は同検定により $P < 0.001$ となった群を示す。

5%マウス血清入りの生理食塩水を投与したコントロール群では、10 Gyの全身ガンマ線照射により、空腸のクリプト生存率は0.26にすぎず、FGF1投与群でも、有意に増加しなかった。一方、各CPP-FGF1キメラタンパク質（CPPF 1、CPPF 2、CPPF 3、及びCPPF 4）を投与した群では、空腸のクリプト生存率は、それぞれ0.45、0.48、0.48、及び0.51となり、コントロール群のみならずFGF1投与群に対しても有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。この結果によっても、CPP-FGF1キメラタンパク質は、FGF1と比較して、放射線により障害を受けた小腸の回復促進効果が極めて高いことが実証された。

[0099] 障害を受けた小腸の回復促進効果に関する評価2

本試験でも、CPP-FGF1キメラタンパク質の放射線による障害を受けた小腸の回復を促進させる効果を評価した。但し、この試験では、クリプ

トの長さを指標とする。クリプトの長さは、クリプトに存在する細胞数、すなわち上皮細胞の増殖能を反映するので、小腸の障害からの回復能力を評価するよい指標となる。

[0100] 8週齢のオスBALB/cマウスを使用し、10Gyのガンマ線を0.5Gy/minの線量率で各群のマウスに全身照射した。その24時間後に、コントロール群では、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、それぞれ10 μ gのFGF1、CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4を、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水で希釈して、マウスの腹腔に投与した。照射3.5日後にBrdUラベリング液を腹腔注射し、細胞分裂している細胞にBrdUを取り込ませ、2時間後にマウスを安楽死させ、空腸を採取した。10%ホルマリンで空腸を固定した後、パラフィン包埋切片を作成し、この切片を、抗BrdU抗体により免疫組織染色し、次いでヘマトキシリン染色した。

[0101] 図8Aは、各群において、BrdUを取り込み抗BrdU抗体が結合した細胞を有するクリプトを示す免疫組織染色した小腸上皮の顕微鏡写真である。顕微鏡により各群の組織像を3画像撮影し、各画像で10クリプトの長さを測定して群毎に平均値を求め、この平均値に基づき生理食塩水を投与したコントロール群に対する相対値を算出した。図8Bは、各群のクリプト長さの平均相対値+/-標準偏差(S.D.)を示し、図中***は、コントロール群に対する多重検定により、 $P < 0.001$ となった試験群を示す。

[0102] FGF1投与群は、コントロール群と比較して、10Gyの全身ガンマ線照射後3.5日後において空腸のクリプトは有意に長かった。一方、各CPP-FGF1キメラタンパク質(CPPF1、CPPF2、CPPF3、及びCPPF4)を投与した群では、空腸のクリプトは、コントロール群と比較して、2倍以上長ただけでなく、FGF1投与群と比較しても有意に長かった($P < 0.01 \sim 0.001$)。

この結果によっても、CPP-C融合FGFは、FGF1と比較して、放射線により障害を受けた小腸の回復促進効果がより高いことが実証された。

[0103] 幹細胞防護効果に関する評価

この試験では、CPP-FGFキメラタンパク質の毛包に存在する幹細胞を放射線から防護する効果について評価した。

[0104] 生後51-53日齢のオスBALB/cマウスの背部より抜毛を行い、休止期である毛包を成長期へと誘導した。抜毛後5日目に、コントロール群では、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、それぞれ100 μ gのFGF1、CPPF1、CPPF2、CPPF3及びCPPF4を、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水で希釈して、マウスの腹腔に投与した。その24時間後に12Gyのガンマ線を0.5Gy/minの線量率で全身照射した。照射24時間後にマウスを安楽死させ、皮膚を採取し、10%ホルマリンで固定した。パラフィン包埋切片を作成し、毛包幹細胞のマーカであるKeratin15に対する抗体で免疫組織化学染色を行った。

[0105] 図9は、非照射群、5%マウス血清入り生理食塩水を投与したコントロール群及び各FGF投与群の免疫組織化学染色した毛包バルジ領域の顕微鏡写真を示し、矢印は、Keratin15陽性毛包幹細胞を示す。

5%マウス血清入り生理食塩水を投与し12Gyの全身ガンマ線照射したコントロール群では、非照射群に対して、毛包バルジ領域のKeratin15陽性毛包幹細胞が減少した。また、FGF1投与群でも、毛包幹細胞は照射により減少した。一方、CPP-FGF1キメラタンパク質(CPPF1、CPPF2、CPPF3、及びCPPF4)を投与した群では、バルジ領域における毛包幹細胞数がコントロール群のみならずFGF1投与群に対しても有意に多く、毛包幹細胞数が非照射コントロール群以上のレベルまでに達した。この結果により、CPP-FGF1キメラタンパク質は、FGF1と比較して、放射線に対して毛包幹細胞を保護・維持する効果がより高いことが実証された。

[0106] 細胞内移行能に関する評価2

この試験では、CPP-FGF1キメラタンパク質の癌細胞に対する細胞

内移行能を評価した。

[0107] ヒト膵臓癌細胞株M I A P a C a - 2及びP A N C - 1を用い、この両細胞に対するF G F 1、F G F 1 2、及びC P P F 2の細胞内移行能を「細胞内移行能に関する評価1」で記述した手順と同様にして測定した。図10Aに示す通り、両細胞に対してF G F 1は細胞内移行できず、F G F 1 2も細胞内移行が少なかった。一方、C P P - C融合F G Fは、軽度細胞内へ移行できた。

癌細胞の増殖を抑制する効果に関する評価1

この試験では、W S T - 1の細胞による分解を利用して、C P P - F G F 1キメラタンパク質の癌細胞の増殖を抑制する効果を評価した。安定なテトラゾリウム塩であるW S T - 1は、代謝活性を持つ細胞の表面で可溶性のフォルマザンに分解されるため、培養中の代謝活性を持つ細胞数と直接的に相関する。そこで、各F G F投与前後のフォルマザン量を450nmでの吸光度により測定して、腫瘍細胞増殖を抑制する効果を評価した。

[0108] 96穴プレートに 1×10^4 個のヒト膵臓癌細胞株M I A P a C a - 2及びP A N C - 1をそれぞれまき、10%F C Sを含有するD M E M培地で6時間培養した。その後、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でヘパリンを培養液に添加し、コントロール群では、F G Fを添加せずに、試験群では更にそれぞれ0.1~1000ng/mLの濃度でF G F 1及びC P P F 2を培養液に添加して0.1mLとした。試験は、各群に3穴割り当てて行った。プレートを37°C、5%CO₂の雰囲気インキュベータに入れて18時間培養した後、10 μ LのW S T - 1試薬（ロッシュアプライドサイエンス社製）を培養液に添加し、さらに4時間培養した。その後、OD450の吸光度を測定して腫瘍細胞増殖を評価した。

[0109] 図10Bは、F G F 1及びC P P F 2の濃度と、細胞増殖に伴い増加するフォルマザン量との関係を示すグラフであり、縦軸はコントロールのOD450値に対する吸光度差を示す。従って、数値が高い程、コントロール群に対して細胞増殖のレベルが高いことを意味する。

[0110] M I A P a C a - 2 細胞では、F G F 1 を加えると吸光度が増加し、コントロールよりも腫瘍細胞が増加したのに対して、C P P F 2 を加えると、1 0 n g / m L 以上の濃度で細胞増殖はコントロールより減少した。一方、P A N C - 1 細胞では、0. 1 ~ 1 n g / m L の F G F 1 ではコントロールよりも細胞が増加するものの、1 0 0 n g / m L 以上では、F G F 1 添加でも細胞増殖がコントロールより減少した。C P P F 2 は、0. 1 n g / m L でコントロールより細胞を著明に減少させ、1 0 0 0 n g / m L まで細胞増殖を抑制した。この結果により、C P P - F G F 1 キメラタンパク質は、膵臓癌細胞の増殖を抑制できることが実証された。

[0111] 癌細胞の増殖を抑制する効果に関する評価 1

この試験では、コロニー形成法により、C P P - F G F 1 キメラタンパク質の癌細胞の増殖を抑制する効果を評価した。

[0112] 各 6 c m ディッシュに 1 0 0 個のヒト膵臓癌細胞株 P A N C - 1 細胞をまき、1 0 % F C S 及び 5 μ g / m l ヘパリンを含有する D M E M 培地をディッシュに加え、コントロール群では F G F を添加せずに、試験群では更に各 F G F を 1 0 0 n g / m l となるように添加した後、各群の培養液を 1 3 日間培養した。その後、1 % メチレンブルー / 3 0 % メタノールで固定染色し、各群のディッシュで染色された 5 0 細胞以上のコロニー数を算出することで、癌細胞の増殖能を評価した。

[0113] 試験は、各群に 2 ディッシュずつ割り当てて行い、各群の 2 ディッシュのコロニー数の平均値を求めた。図 1 1 A は、コントロール群及び各 F G F を添加した群の染色後の培地を示す写真である。図 1 1 B は、各群のコロニー数の平均値 + / - 標準偏差 (S . D .) を示し、図中 ** は、コントロール群に対する多重検定により、 $P < 0. 0 1$ となった試験群を示す。

[0114] F G F を添加しなかったコントロール群では、コロニー数 (平均値) は 1 8 . 5 個に達した。また、F G F 1 を添加した群では、コントロール群に対して有意にコロニー数 (平均値) が減少しなかった。一方、C P P - F G F 1 キメラタンパク質 (C P P F 1 、 C P P F 2 、 C P P F 3 及び C P P F 4

)を添加した群では、それぞれコロニー数が11.5個、9.5個、11個、及び10個と、コントロール群に対して有意にコロニー数が減少した。コントロール群に対するコロニー減少率は、CPPF1添加群が37.8%、CPPF2添加群が48.6%、CPPF3添加群が40.5%、CPPF4添加群が45.9%と、いずれのCPP-FGF1キメラタンパク質を添加した群でも約40%コロニー数が減少した。FGF1を添加した群と比べても、CPP-FGF1キメラタンパク質を添加した群では、コロニー数は有意に減少した($P < 0.05 \sim 0.01$)。この結果により、CPP-FGF1キメラタンパク質が、FGF1よりも有意に癌の増殖を抑制し得ることが実証された。

[0115] 癌細胞の増殖を抑制する効果に関する評価2

この試験では、CPP-FGF1キメラタンパク質の癌細胞の腫瘍形成を抑制する効果をマウス移植モデルを用いて評価した。

マウスを用いた実験は、事前に承認された動物実験計画に基づき動物倫理に配慮しながら実施された。生後7週齢のオスSCIDマウスの右大腿部に、 1×10^6 個のヒト膀胱癌細胞株M1APaCa-2を10 μ lのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁して皮下注射した。その1時間後、24時間後、48時間後、7日後、14日後及び21日後の合計6回、コントロール群では、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水をマウスの腹腔に投与し、試験群では、10 μ gのCPP-FGF1キメラ蛋白質(CPPF2)を、0.5mlの5%マウス血清入り生理食塩水で希釈したものを投与した。癌細胞株皮下注射した後、皮下腫瘍の大きさを経時的にデジタルノギスで計測して、各群5匹の平均体積を算出した。

図12は、コントロール群及び試験群における右大腿皮下腫瘍の経時的体積変化を示し、図中、矢印は腹腔内投与の時期を示す。CPPF2を投与した試験群では、腫瘍の平均体積が18日以降、31日までコントロール群よりも常に小さかった。この結果により、CPP-FGF1キメラタンパク質に、癌細胞の腫瘍形成を抑制する効果があることが示された。

[0116] 癌細胞転移抑制効果に関する評価

この試験では、浸潤アッセイによりCPP-FGF1キメラタンパク質による癌細胞の転移を抑制する効果を評価した。癌細胞は細胞転移を起こす際にプロテアーゼを分泌して基底膜を破壊して遊走する特性があり、この癌細胞の特性を利用する浸潤アッセイを使ってCPP-FGF1キメラタンパク質の癌細胞浸潤抑制効果を評価した。

[0117] 24ウェルプレートのボイデンチャンバーのフィルターに66 μ gのマトリゲル20 μ Lを被覆しゲル化した。その後、下部ウェルに650 μ Lの10%FCSを含有するDMEM培養液を加えた。一方、 1.5×10^5 個のMIA PaCa-2細胞又はPANC-1細胞を100 μ Lの0.35%BSAを含有するDMEM培養液に懸濁し、この懸濁液を上部ウェルに加えた。

次いで、下部ウェル及び上部ウェルの培養液に5 μ g/mLヘパリンを添加し、コントロール群のウェルではFGFを無添加とし、試験群のウェルでは、更に100ng/mLになるようにそれぞれFGF1及びCPPF2を加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の雰囲気インキュベータにプレートを入れて24時間培養し、癌細胞のゲルへの浸潤を誘発させた。浸潤した細胞をチャンバーのフィルターごとディフクイック (Sysmex社製) で固定染色し、染色された細胞数を算出して浸潤細胞数とした。試験は、各群に4つのチャンバーを割り当てて行い、その平均値を求め、培養液に懸濁した細胞数に対する各群の浸潤細胞数の平均値の割合を求めて浸潤細胞率とした。

[0118] 図13Aは、ゲルへ浸潤した細胞をディフクイックで固定染色したフィルターの顕微鏡写真である。図13Bは、各群の浸潤細胞率の平均値+/-標準偏差 (S. D.) を表し、図中、**はコントロール群に対する多重検定により、 $P < 0.01$ となった試験群を示し、***は $P < 0.001$ となった試験群を示す。

[0119] MIA PaCa-2細胞は、コントロール群では2.34%浸潤したが、FGF1添加群では1.52%、CPPF2添加群では1.03%浸潤した。PANC-1細胞は、コントロール群では1.27%の浸潤率したのに対

して、FGF1添添加群では0.81%、CPPF2添添加群では0.26%浸潤した。これをコントロール群に対する浸潤低下率で見ると、FGF1はMIA PaCa細胞で35%、PANC-1で36%癌細胞浸潤を抑制したのに対して、CPP-C融合FGF(CPPF2)はMIA PaCa細胞で56%、PANC-1で80%と癌細胞浸潤をより強力に抑制した。これにより、CPP-FGF1キメラタンパク質がFGF1と比較して癌細胞の浸潤能をより低下させ、癌の転移をより抑制することが実証された。

請求の範囲

[請求項1] 維芽細胞増殖因子1（以下、FGF1という）又は維芽細胞増殖因子2（以下、FGF2という）と、

線維芽細胞増殖因子11～14（以下、それぞれFGF11、FGF12、FGF13及びFGF14という）の何れかのC末端領域に存在する膜透過ドメインのアミノ酸配列、又はそれに対して60%以上の配列同一性を有し、且つ親水性アミノ又は中性アミノ酸と酸疎水性アミノ酸との配列パターンを共通にするアミノ酸配列を含む膜透過ペプチド（以下CPP-Cという）とを含む、キメラタンパク質；

FGF1又はFGF2をコードするDNA配列と、CPP-CをコードするDNA配列とを含むDNA分子、或いは

FGF1又はFGF2をコードするDNA配列と、CPP-CをコードするDNA配列とを含む、ベクター。

[請求項2] 前記FGF1は、以下のアミノ酸配列の何れかを含み、且つFGF1活性が維持されている、請求項1に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター：

- 1) 配列番号1～5の何れかによって表されるアミノ酸配列、
- 2) 配列番号1によって表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を有し、且つ該アミノ酸配列の22～28、及び133のアミノ酸が維持されているアミノ酸配列、
- 3) 配列番号2によって表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を有し、且つ該アミノ酸配列の22～28、及び133のアミノ酸が保持されているアミノ酸配列、
- 4) 配列番号3によって表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を有し、且つ該アミノ酸配列の22～28、及び133のアミノ酸が保持されているアミノ酸配列、
- 5) 配列番号4に表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を有し、且つ該アミノ酸配列の22～28、及び133のアミノ

酸が保持されているアミノ酸配列、並びに

6) 配列番号5に表されるアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を有し、且つ該アミノ酸配列の22~28、及び133のアミノ酸が保持されているアミノ酸配列。

[請求項3] 配列番号1~5の何れかによって表される1~150のアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有する、請求項1又は2に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項4] 前記FGF2は、以下のアミノ酸配列の何れかを含み、且つFGF2活性が維持されている、請求項1に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター：

1) 配列番号6~10の何れかによって表されるアミノ酸配列、

2) 配列番号6によって表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換若しくは欠失され、又はそれに他のアミノ酸が付加されており、該アミノ酸配列の134~288のアミノ酸に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、

3) 配列番号7によって表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換若しくは欠失され、又はそれに他のアミノ酸が付加されており、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、

4) 配列番号8によって表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換若しくは欠失され、又はそれに他のアミノ酸が付加されており、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、

5) 配列番号9によって表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換若しくは欠失され、又はそれに他のアミノ酸が付加されており、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、

6) 配列番号10によって表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が

置換若しくは欠失され、又はそれに他のアミノ酸が付加されており、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列。

[請求項5]

前記CPP-Cは、

1) 配列番号11～29の何れかで表されるアミノ酸配列、或いは
2) 該アミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換されており、該アミノ酸配列に対して少なくとも60%の配列同一性を有し、且つ親水性アミノ酸又は中性アミノ酸と疎水性アミノ酸との配列パターンが共通するアミノ酸配列を含む、請求項1～4の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項6]

前記CPP-Cは、

1) 配列番号11～14の何れかで表されるアミノ酸配列、或いは
2) 該アミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換されており、該アミノ酸配列に対して少なくとも60%の配列同一性を有し、且つ親水性アミノ酸又は中性アミノ酸と疎水性アミノ酸との配列パターンが共通するアミノ酸配列を含む、請求項1～4の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項7]

前記CPP-Cは、以下のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含む、請求項5又は6に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

- 1 番目： プロリン、又はロイシン
- 2 番目： イソロイシン、又はロイシン
- 3 番目： グルタミン酸、又はリジン
- 4 番目： バリン
- 5 番目： システイン、又はアラニン
- 6 番目： メチオニン、又はバリン

7 番目： チロシン

8 番目： アルギニン、リジン、又はグルタミン

9 番目： グルタミン酸

10 番目： プロリン

[請求項8] 前記CPP-Cは、40以下のアミノ酸からなる請求項1～7の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項9] 前記CPP-Cは、FGF11、FGF12、FGF13及びFGF14の何れかに由来する連続する25以下のアミノ酸からなる、請求項8に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項10] 前記CPP-Cは、前記FGF1のC末端領域に、直接又は連結部を介して結合又は挿入されている、請求項1～9の何れか1項に記載の医薬用組成物。

[請求項11] 前記キメラタンパク質は、配列番号30～33の何れかに表されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～10の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項12] 前記キメラタンパク質は、配列番号30～33の何れかに表されるアミノ酸配列の22～28、及び133のアミノ酸を維持している、請求項11に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクター。

[請求項13] 請求項1～10の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子又はベクターを含有する、医薬用又は細胞培養用組成物。

[請求項14] 薬学的に許容される担体を含有する請求項13に記載の医薬用組成物。

[請求項15] 細胞の維持又は増殖のため、幹細胞の防護のため、細胞のアポトーシスを抑制するため、細胞の遊走を促進するため、腫瘍細胞の増殖又は転移を抑制するため、又は虚血性組織の機能回復のために使用される、請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物。

- [請求項16] 創傷治癒促進のため、放射線被ばく又は化学療法などの幹細胞の死滅を引き起こす処置に対する幹細胞の保護、放射線による組織の障害を予防又は治療するため、虚血性疾患を予防又は治療するため、或いは悪性腫瘍の治療のために使用される、請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物。
- [請求項17] 腸管の放射線による障害を予防又は治療するため、放射線又は化学療法による毛包の障害を予防又は治療するため、下肢虚血性疾患の予防又は治療のため、虚血性冠動脈疾患の予防又は治療のため、糖尿病性皮膚潰瘍又は糖尿病性壊疽の予防又は治療のため、鼓膜穿孔の治療のため、或いは悪性腫瘍の増殖又は転移を抑制するために使用される、請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物。
- [請求項18] 請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物の治療有効量をそれを必要とする対象に投与する工程を含む、FGF1又はFGF2が関与する生理現象に起因する疾患又は症状の予防又は治療方法。
- [請求項19] 細胞の維持又は増殖のため、幹細胞の防護のため、細胞のアポトーシスを抑制するため、細胞の遊走を促進するため、腫瘍細胞の増殖又は転移を抑制するため、又は虚血性組織の機能回復のための、請求項18に記載の方法。
- [請求項20] 創傷治癒促進のため、放射線被ばく又は化学療法などの幹細胞の死滅を引き起こす処置に対して幹細胞を保護するため、放射線による組織の障害を予防又は治療するため、虚血性疾患を予防又は治療するため、或いは悪性腫瘍の治療のための、請求項18に記載の方法。
- [請求項21] 腸管の放射線による障害を予防又は治療するため、放射線又は化学療法による毛包の障害を予防又は治療するため、下肢虚血性疾患の予防又は治療のため、虚血性冠動脈疾患の予防又は治療のため、糖尿病性皮膚潰瘍又は糖尿病性壊疽の予防又は治療のため、鼓膜穿孔の治療

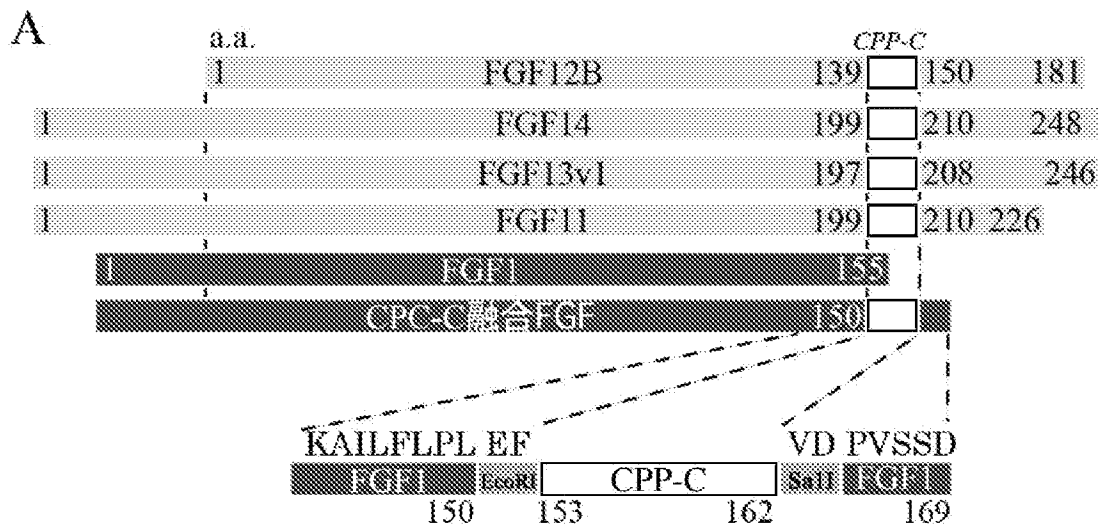
のため、或いは悪性腫瘍の増殖又は転移を抑制するための、請求項18に記載の方法。

[請求項22] 細胞の維持又は増殖のため、幹細胞の防護のため、細胞のアポトーシスを抑制するため、細胞の遊走を促進するため、腫瘍細胞の増殖又は転移を抑制するため、又は虚血性組織の機能回復のための医薬を調製するための、請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物の使用。

[請求項23] 創傷治癒促進のため、放射線被ばく又は化学療法などの幹細胞の死滅を引き起こす処置に対して幹細胞を保護するため、放射線による組織の障害を予防又は治療するため、虚血性疾患を予防又は治療するため、或いは悪性腫瘍の治療のための医薬を調製するための、請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物の使用。

[請求項24] 腸管の放射線による障害を予防又は治療するため、放射線又は化学療法による毛包の障害を予防又は治療するため、下肢虚血性疾患の予防又は治療のため、虚血性冠動脈疾患の予防又は治療のため、糖尿病性皮膚潰瘍又は糖尿病性壊疽の予防又は治療のため、鼓膜穿孔の治療のため、或いは悪性腫瘍の増殖又は転移を抑制するための医薬を調製するための、請求項1～14の何れか1項に記載のキメラタンパク質、DNA分子、ベクター又は組成物の使用。

[図1]



B CPP-C

FGF12 P I E V C M Y R E P

FGF14 P L E V A M Y R E P

FGF13 P L K V A M Y K E P

FGF11 L L E V A M Y Q E P

斜体:FGF12との相違

C CPP-C

FGF12 P L E V C M Y R E P

FGF14 P L E V A M Y R E P

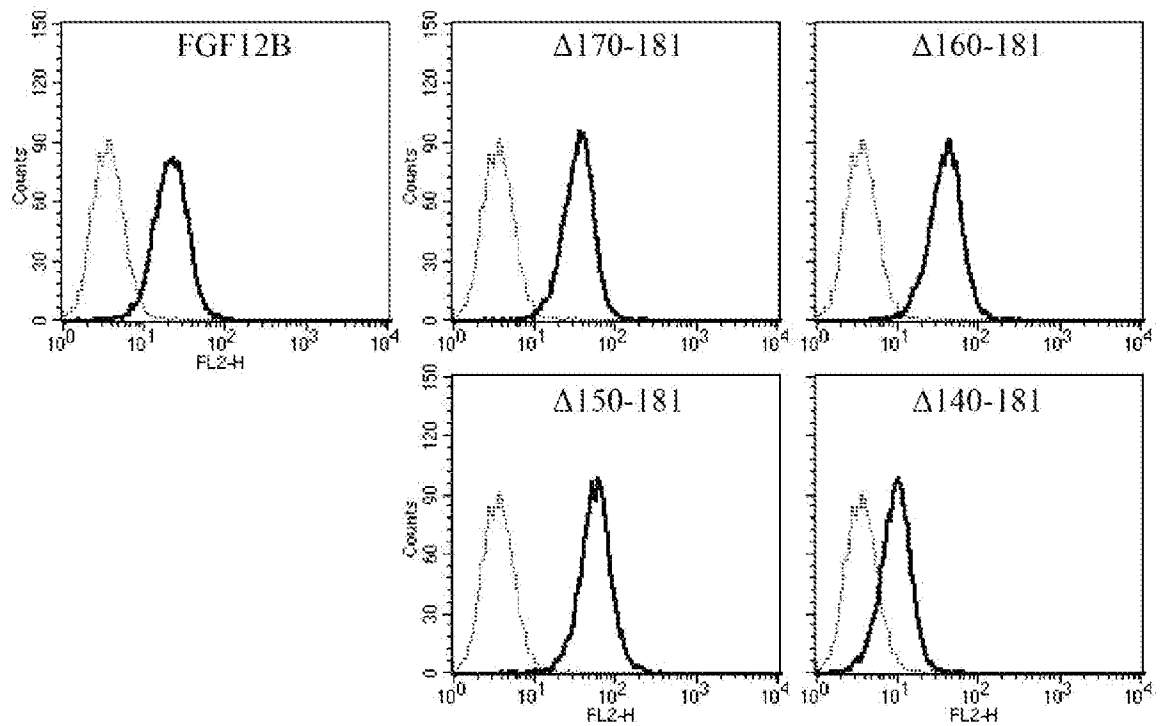
FGF13 P L K V A M Y K E P

FGF11 L L E V A M Y Q E P

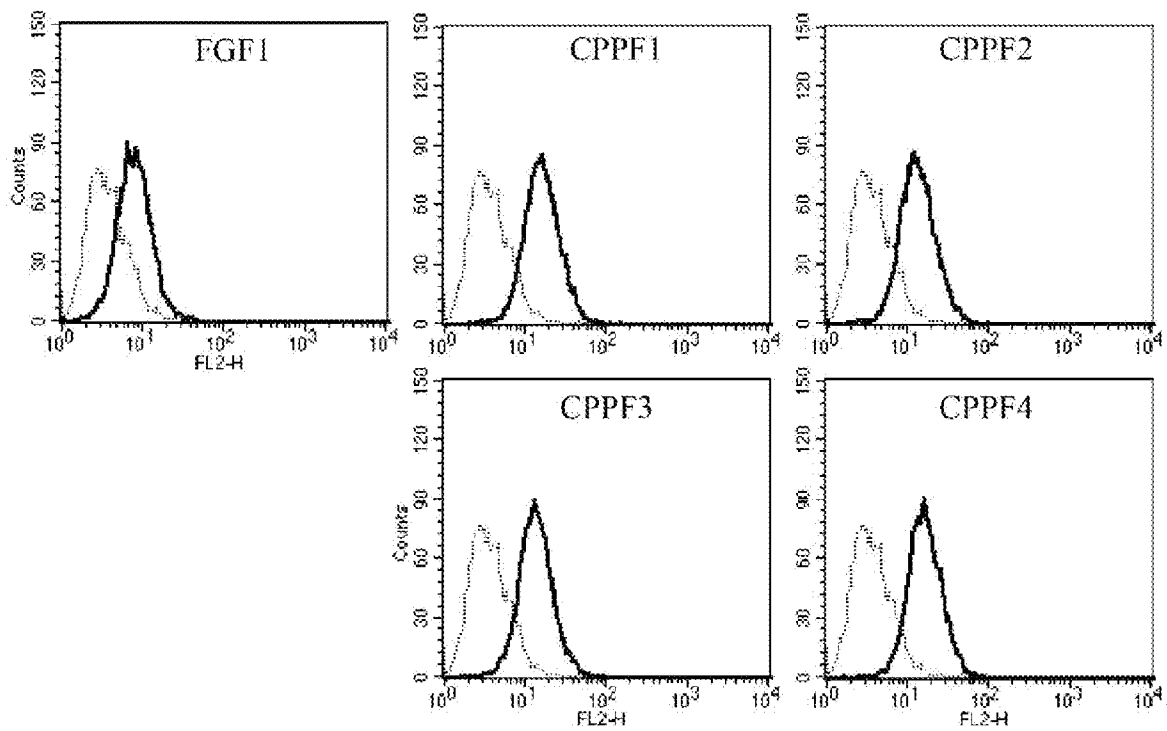
斜体:親水性 下線:中性 その他:疎水性

[図2]

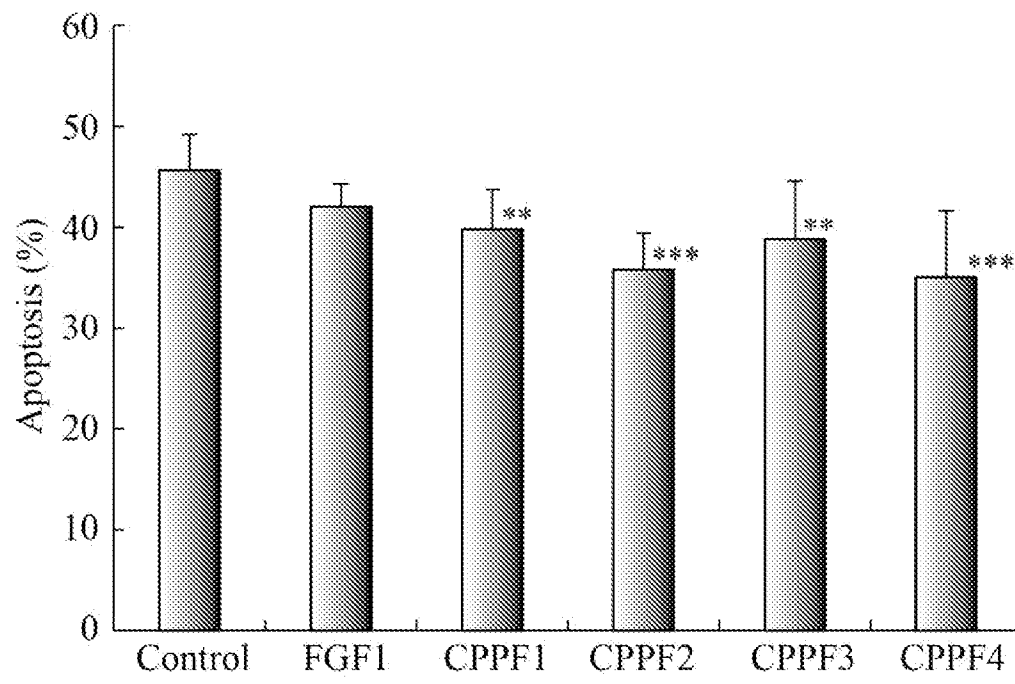
A



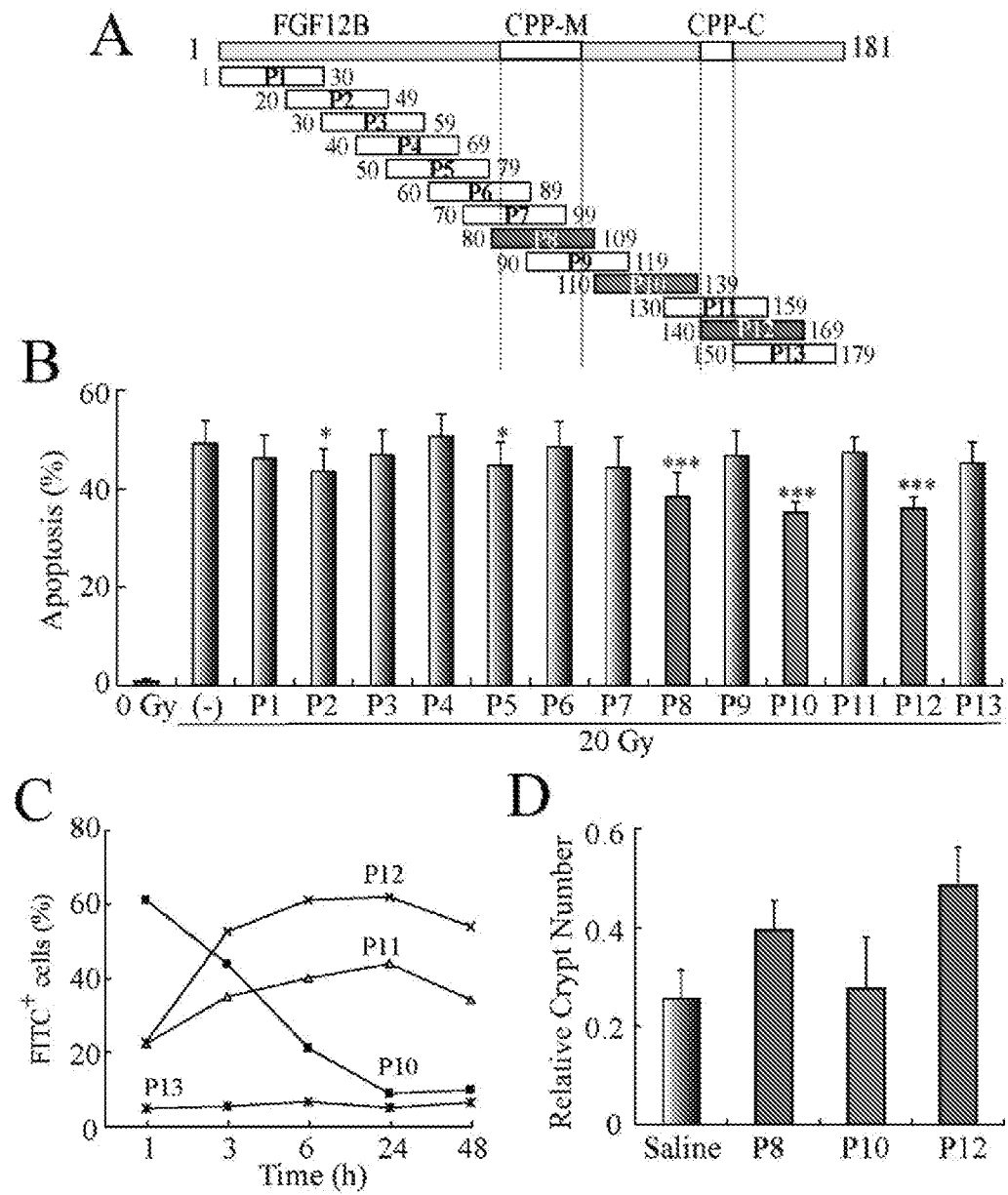
B



[圖3]

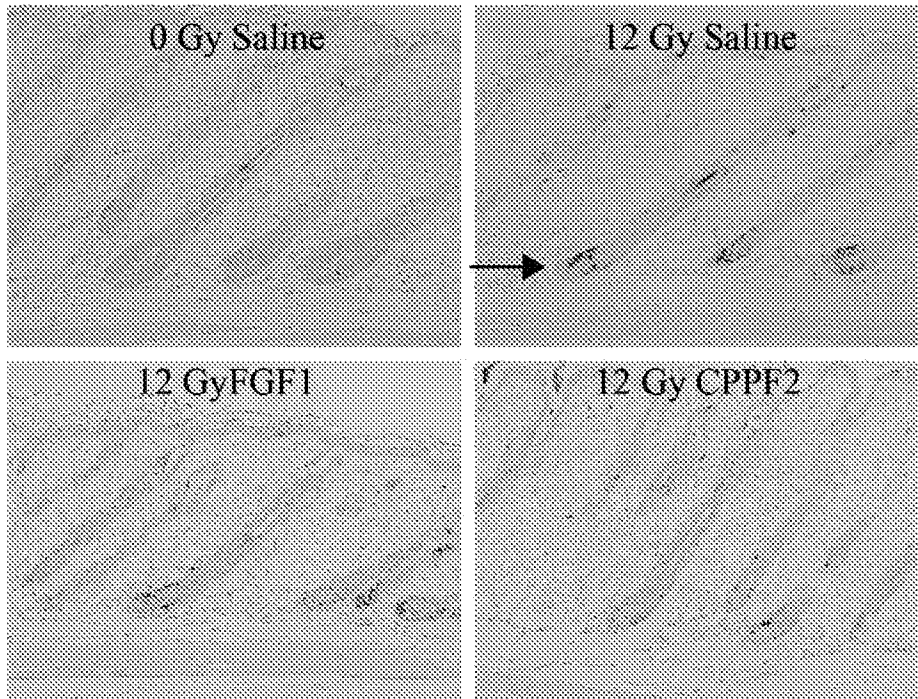


[圖4]

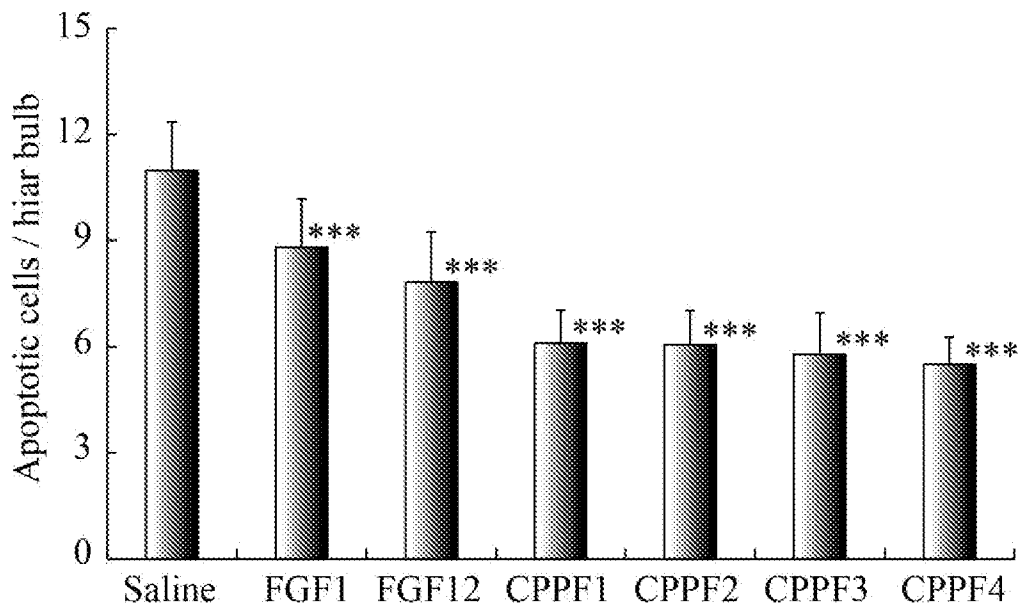


[圖5]

A

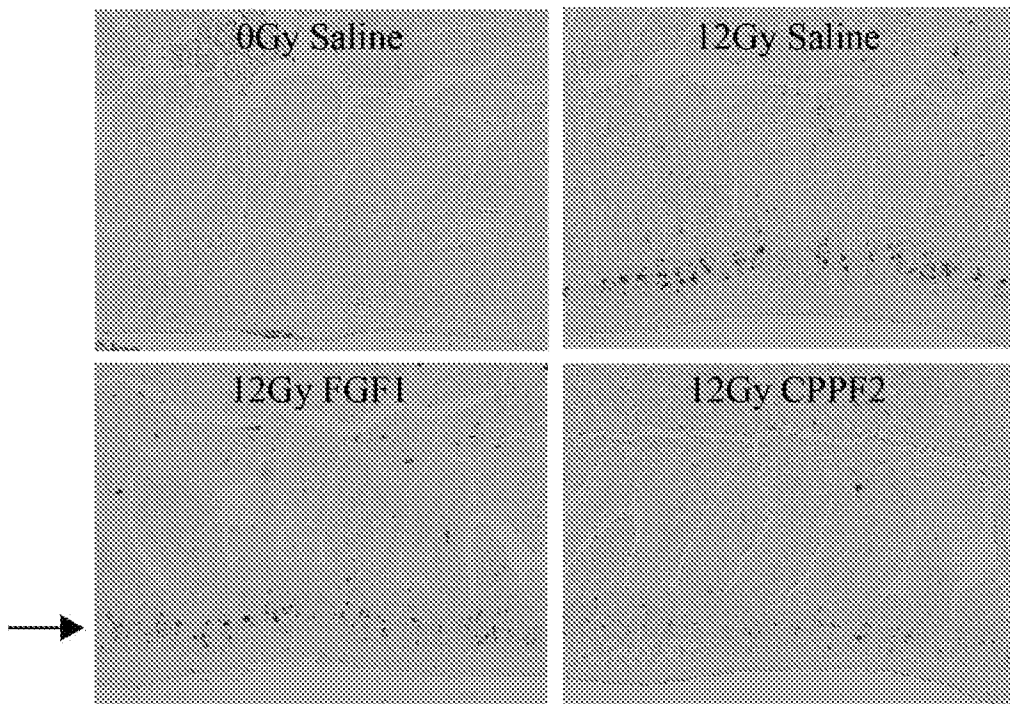


B

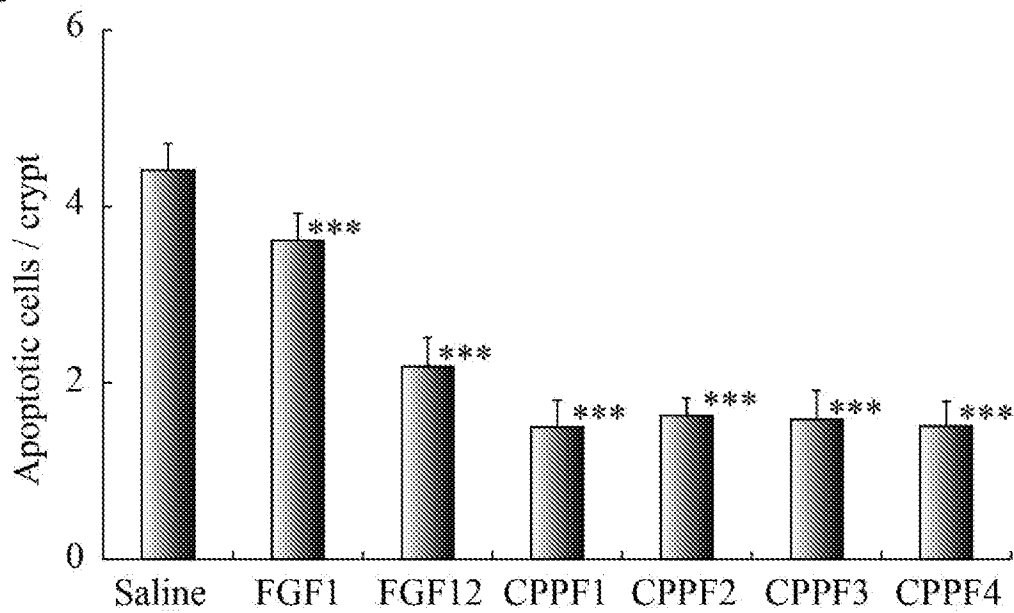


[図6]

A

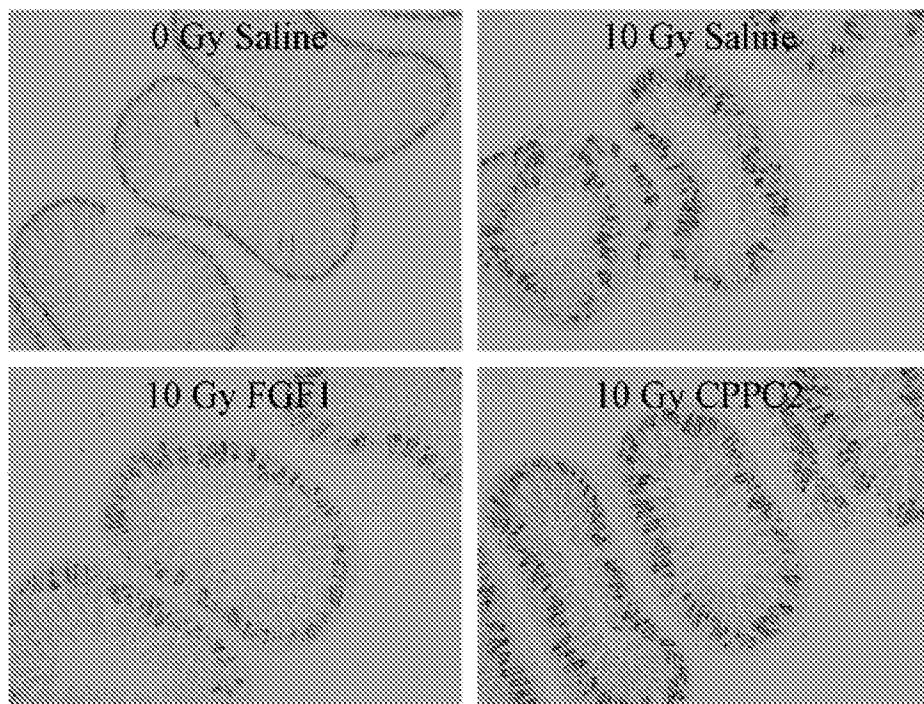


B

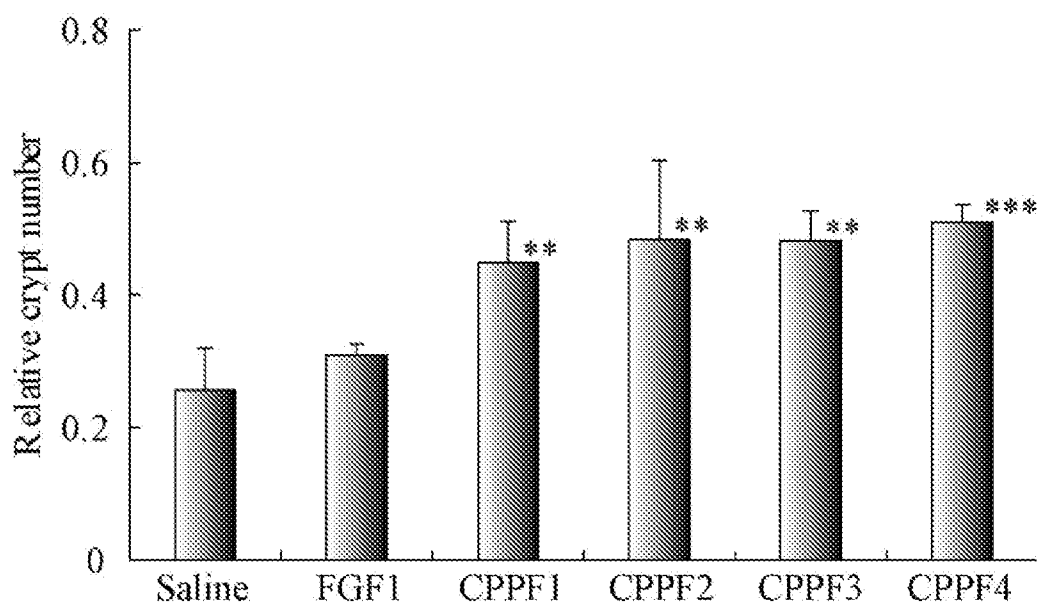


[図7]

A

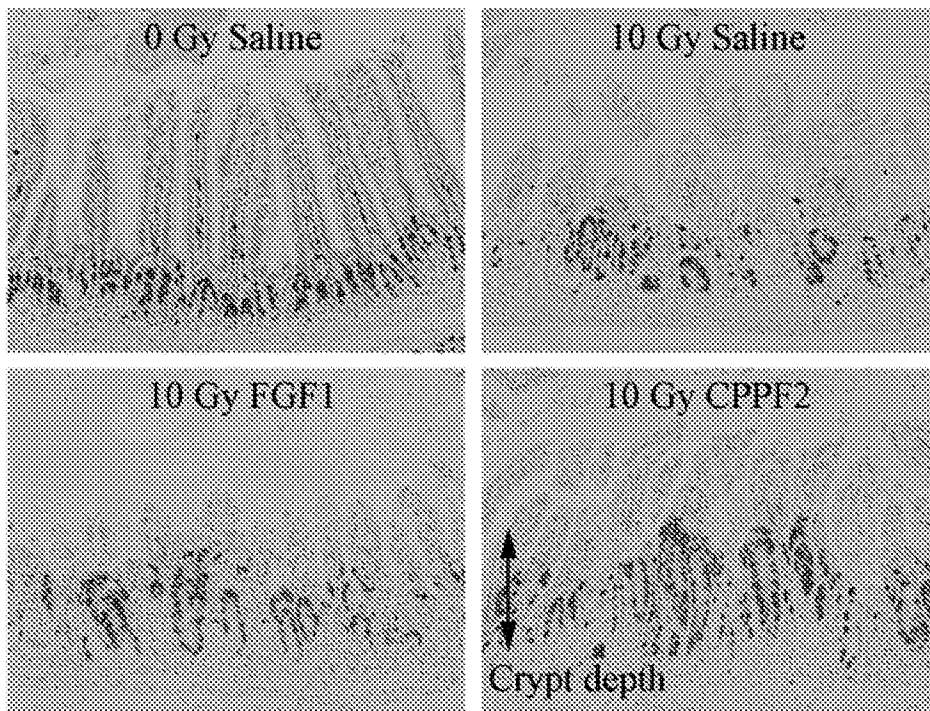


B

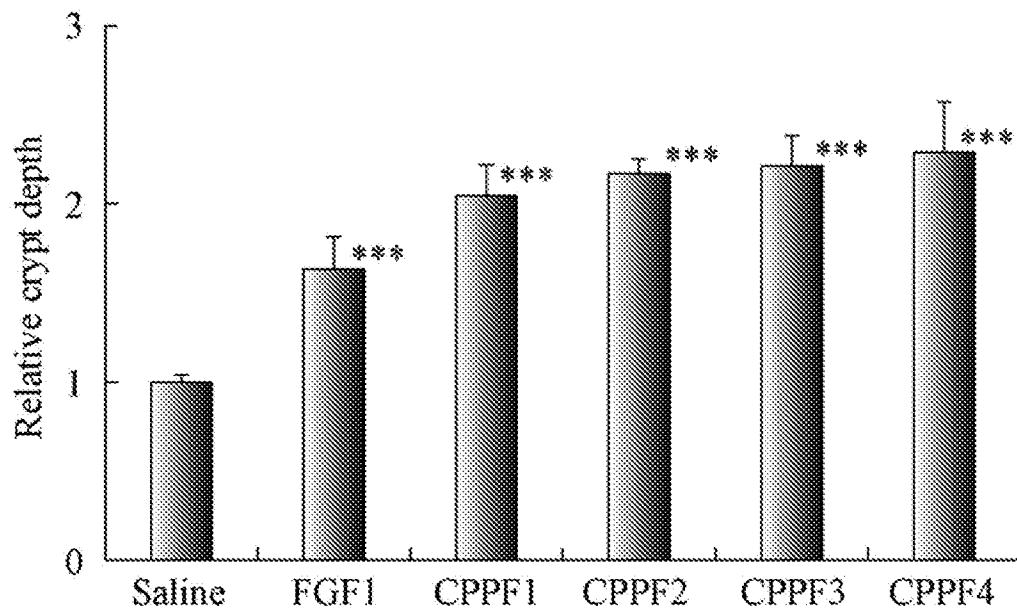


[圖8]

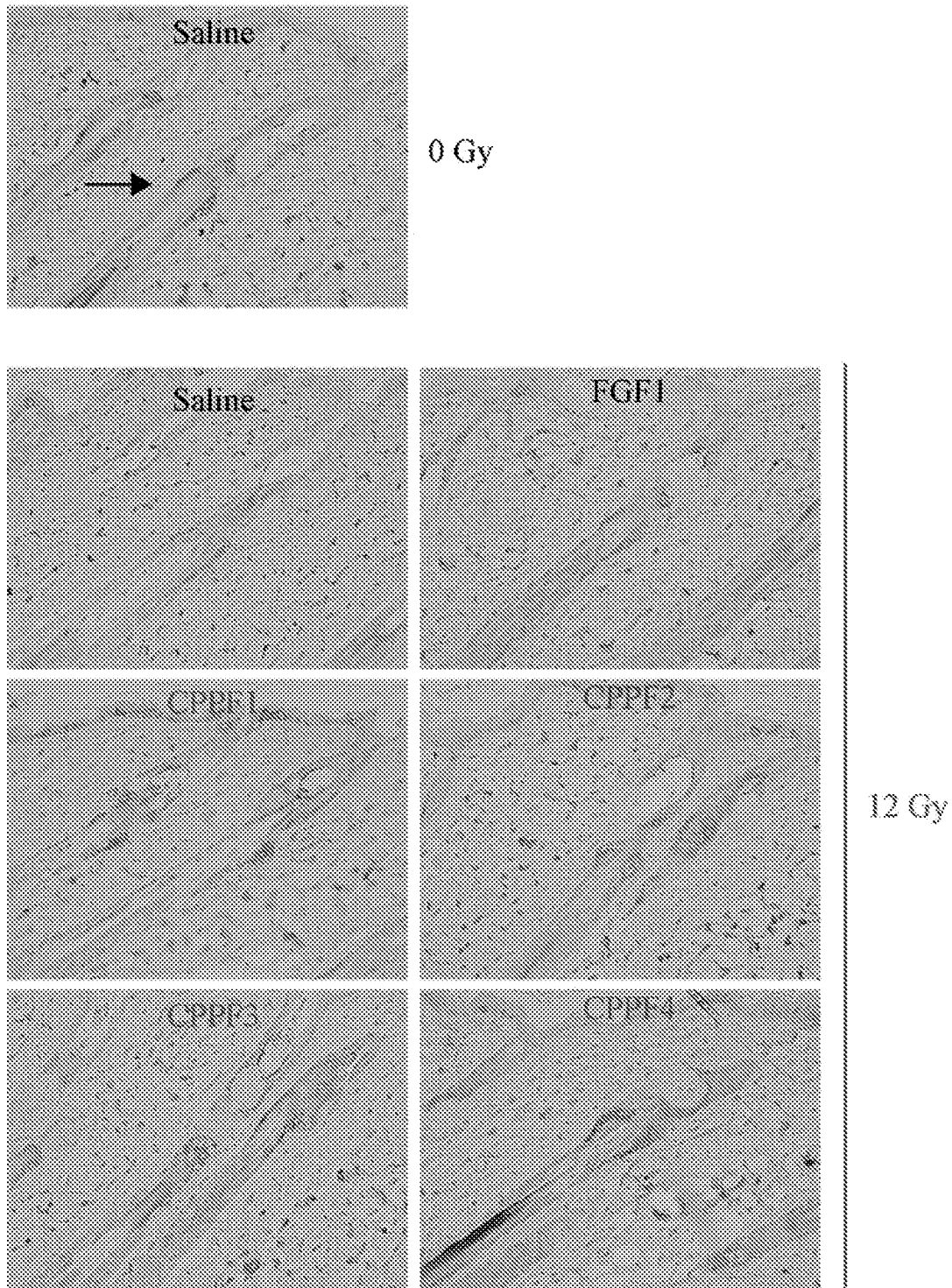
A



B

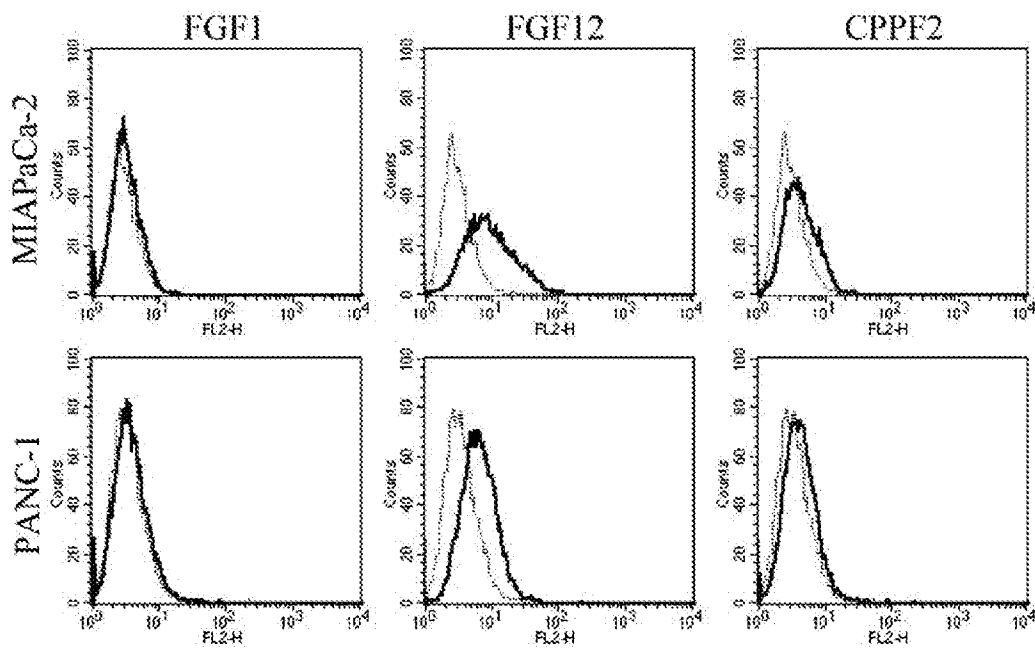


[図9]

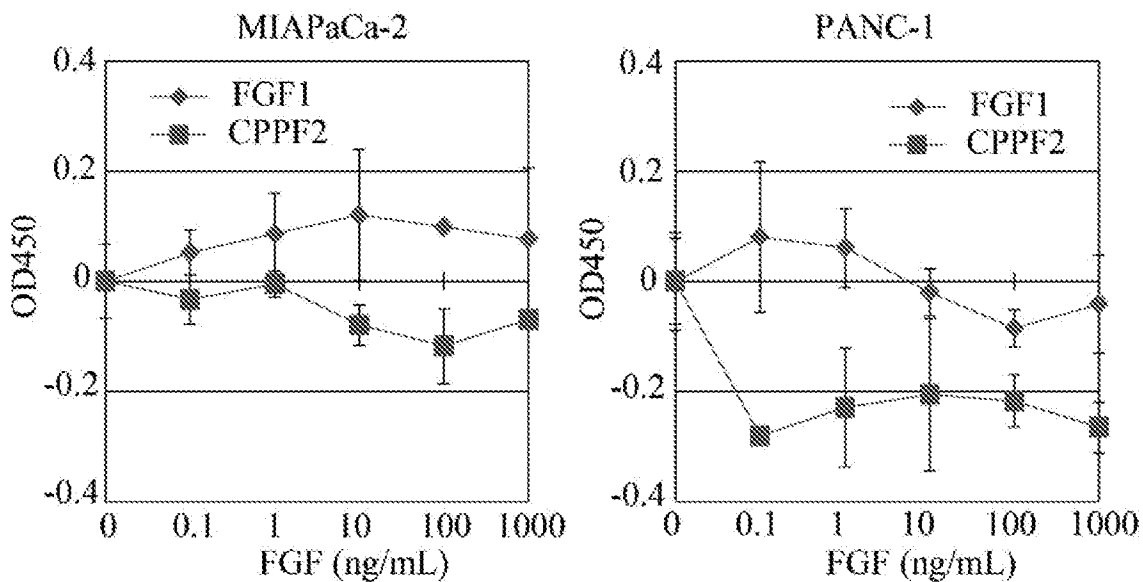


[Figure 10]

A

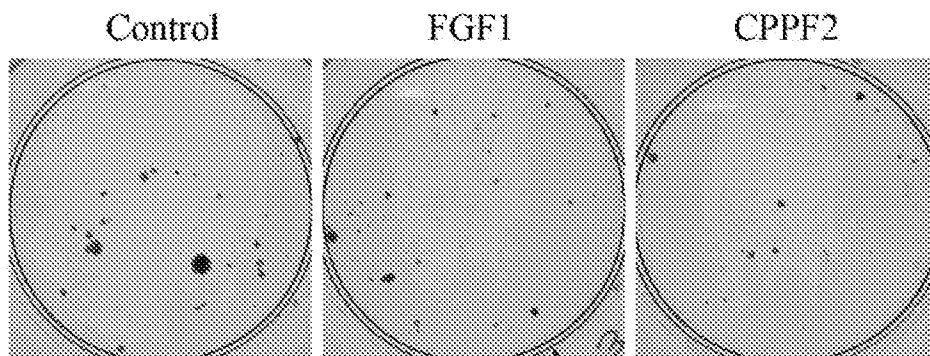


B

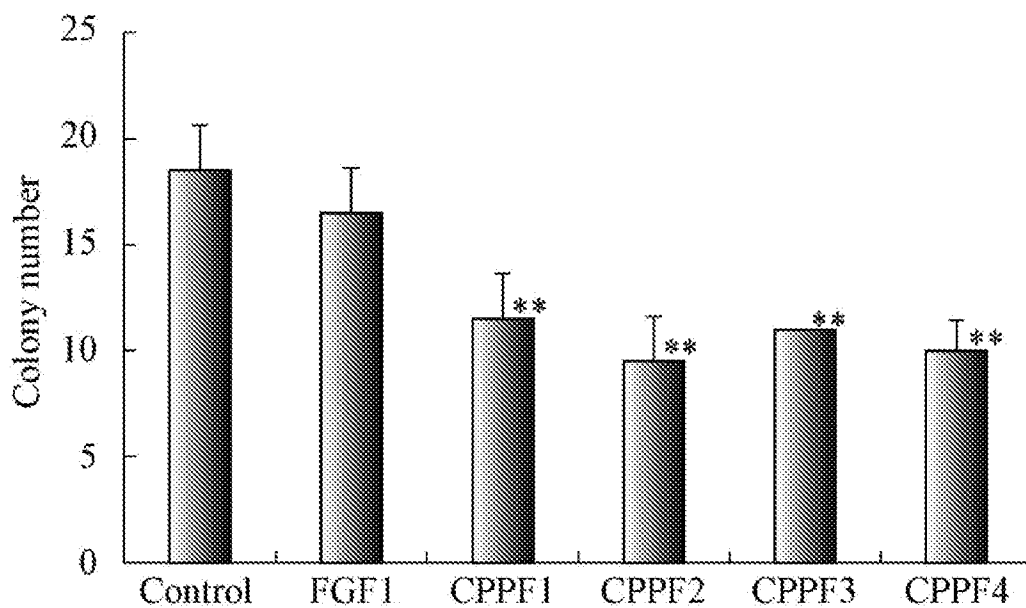


[図11]

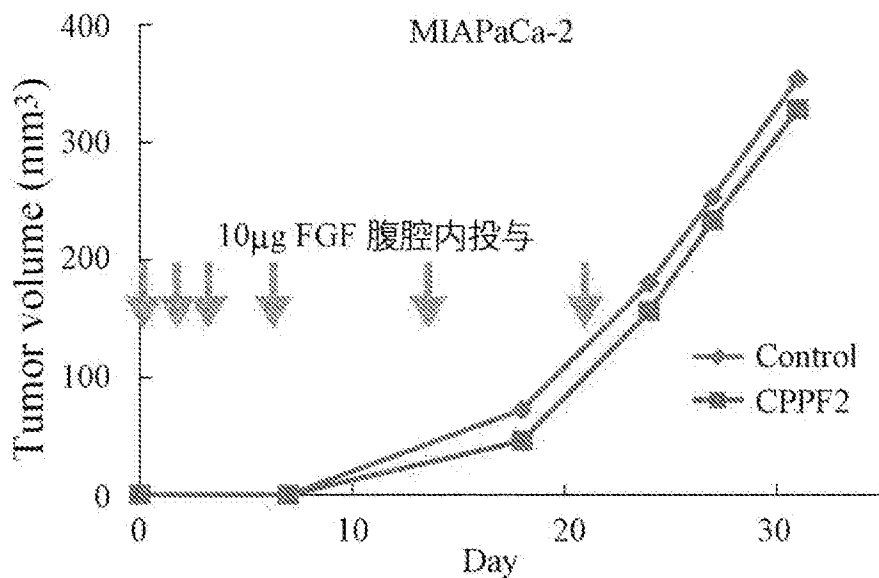
A



B

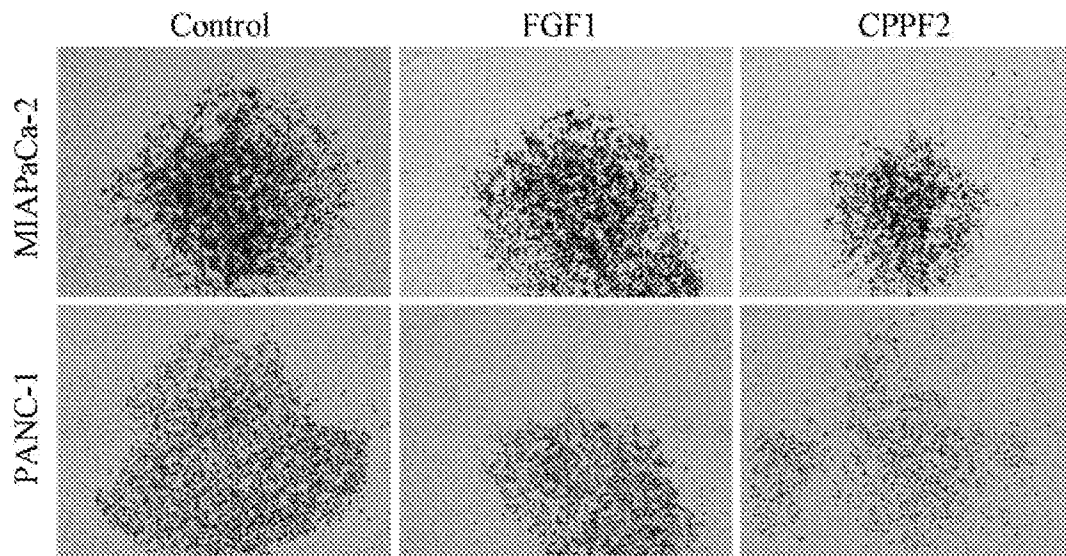


[図12]

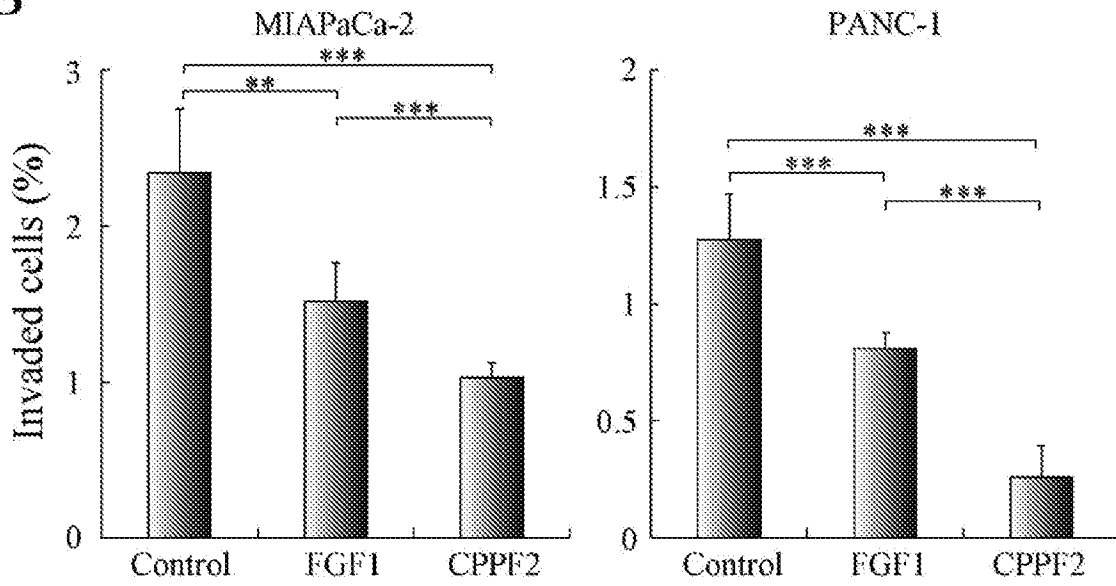


[圖13]

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K38/22, A61K48/00, A61P1/00, A61P3/10, A61P9/10, A61P17/00, A61P17/14, A61P27/16, A61P35/00, A61P35/04, A61P39/00, A61P43/00, C12N5/00, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	NAKAYAMA F. et al., Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12, J.Biol.Chem., 2011 Jul 22, 286 (29), p.25823-34	1-12/13-17, 22-24
Y	Fumiaki NAKAYAMA et al., "FGF12 no Shocho ni Taisuru Hoshasen Bogo Koka ni Tsuite", Proceedings of the Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society, 01 November 2011 (01.11.2011), 54, page 162, PE-2	13-17, 22-24

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 November, 2013 (29.11.13)	Date of mailing of the international search report 10 December, 2013 (10.12.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080382

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAGIWARA A.et al., Comparison of expression profiles of several fibroblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1, Radiat.Res.,2009 Jul,172(1), p.58-65(abstract),Data Revised 2009 Aug 3, PubMed[online], National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [retrieved on 28 Nov 2013], Retrieved from the Internet< http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580507 >	13-17,22-24
Y	NAKAYAMA F.et al., Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1, Exp.Dermatol.,2009 Oct,18(10),p.889-92	13-17,22-24
Y	CHEN G.et al., Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells, Stem Cells,2012 Apr,30(4),p.623-30	13-17,22-24
Y	LIU Z.et al., Identification of a fibroblast growth factor receptor 1 splice variant that inhibits pancreatic cancer cell growth, Cancer Res.,2007 Mar 15,67(6),p.2712-9	13-17,22-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080382

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

*C12N15/09(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P1/00(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i,
A61P17/00(2006.01)i, A61P17/14(2006.01)i, A61P27/16(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, A61P39/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080382

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 18-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18-21 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. 特別ページ参照		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09, A61K38/22, A61K48/00, A61P1/00, A61P3/10, A61P9/10, A61P17/00, A61P17/14, A61P27/16, A61P35/00, A61P35/04, A61P39/00, A61P43/00, C12N5/00, C12N5/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Thomson Innovation		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	NAKAYAMA F. et al., Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12, J. Biol. Chem., 2011 Jul 22, 286(29), p. 25823-34	1-12 /13-17, 22-24
Y	中山 文明, 他 6 名, FGF12 の小腸に対する放射線防護効果について, 日本放射線影響学会大会講演要旨集, 2011 Nov 1, 54, p. 162, PE-2	13-17, 22-24
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29. 11. 2013	国際調査報告の発送日 10. 12. 2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 渡邊 潤也 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3 1 3 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HAGIWARA A. et al., Comparison of expression profiles of several fibroblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1, <i>Radiat. Res.</i> , 2009 Jul, 172(1), p. 58-65 (abstract), Data Revised 2009 Aug 3, PubMed[online], National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [retrieved on 28 Nov 2013], Retrieved from the Internet< http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580507 >	13-17, 22-24
Y	NAKAYAMA F. et al., Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1, <i>Exp. Dermatol.</i> , 2009 Oct, 18(10), p. 889-92	13-17, 22-24
Y	CHEN G. et al., Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells, <i>Stem Cells</i> , 2012 Apr, 30(4), p. 623-30	13-17, 22-24
Y	LIU Z. et al., Identification of a fibroblast growth factor receptor 1 splice variant that inhibits pancreatic cancer cell growth, <i>Cancer Res.</i> , 2007 Mar 15, 67(6), p. 2712-9	13-17, 22-24

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 18-21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項18-21は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び[PCT規則39.1(iv)]の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

発明の属する分野の分類

C12N15/09(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i,
A61P3/10(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/14(2006.01)i,
A61P27/16(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, A61P39/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i