

明 細 書

発明の名称： 間葉系幹細胞の動員活性を有するペプチド

技術分野

[0001] 本願は、間葉系幹細胞の動員活性を有するペプチド、間葉系幹細胞の動員用組成物および間葉系幹細胞の動員に基づく疾患治療薬に関する。

背景技術

[0002] 骨髓液等に含まれている間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、神経、上皮等、種々の組織に分化できる能力（多分化能）を有していることから、近年、培養により増殖させた骨髓由来間葉系幹細胞を用いて再生医療（細胞移植治療）を行う試みが広くなされている。しかし、間葉系幹細胞を含有する骨髓血の採取は、腸骨に太い針を何度も刺入する観血的手法で行われるためドナーへの負担が大きい。また、間葉系幹細胞は体外で継代培養を続けると次第に増殖能力や多分化能を失ってしまう。さらに、生体内移植の安全性を保証する高品質管理に基づいた間葉系幹細胞の培養はCPC（cell processing center）等の特殊培養設備を必要とするため、限られた大学や企業でしか実施できないのが現状である。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：PNAS 2011 Apr 19;108(16):6609-14

特許文献

[0004] 特許文献1：W02008/053892

特許文献2：W02009/133939

特許文献3：W02012/147470

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本願は、細胞移植治療の問題点を克服できる新たな再生医療の技術を開発することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らはこれまでに、独自の研究結果に基づいて間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を有する人工配列ペプチド「1r10」を見出し、当該ペプチドについて特許出願を行っている（PCT/JP2019/039232）。今回、本発明者らは、人工配列ペプチド「1r10」の部分配列からなるペプチド（以下、「1r10断片ペプチド」とも称する）を複数合成し、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性の有無を調べた結果、特定のアミノ酸配列を有する1r10断片ペプチドが当該活性を示すことを見出した。本願は、かかる知見に基づき、間葉系幹細胞の末梢血への動員を介して種々の疾患に治療効果を示すと考えられるペプチドを提供する。

[0007] すなわち、本願は以下を提供する。

[1]

以下から選択されるペプチドを含有する、末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

（c）配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド。

[2]

以下から選択されるペプチドを含有する、末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療に用いるための組成物：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) 配列番号：１のアミノ酸配列において１個～５個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド；および

(c) 配列番号：１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔３〕

疾患または病的状態の治療が、炎症抑制治療、免疫調節治療、組織の再生誘導治療、および組織の線維化抑制治療から選択される、〔２〕に記載の組成物。

〔４〕

疾患または病的状態が、炎症性疾患、自己免疫疾患、組織の損傷、虚血もしくは壊死を伴う疾患、および線維性疾患から選択される、〔２〕に記載の組成物。

〔５〕

疾患または病的状態が、炎症性腸疾患である、〔２〕に記載の組成物。

〔６〕

疾患または病的状態が、潰瘍性大腸炎である、〔２〕に記載の組成物。

〔７〕

疾患または病的状態が、アトピー性皮膚炎である、〔２〕に記載の組成物。

〔８〕

疾患または病的状態が、脳梗塞である、〔２〕に記載の組成物。

〔９〕

以下から選択されるペプチドを含有する、炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎および脳梗塞から選択される疾患の治療に用いるための組成物：

(a) 配列番号：１のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：１７

または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

(c) 配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド。

[10]

以下から選択されるペプチド：

(a) 配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

(c) 配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド。

[A1]

以下から選択されるペプチドの有効量を対象に投与する工程を含む、末梢血へ間葉系幹細胞を動員する方法：

(a) 配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

(c) 配列番号：１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔Ａ２〕

以下から選択されるペプチドの有効量を対象に投与する工程を含む、末梢血への間葉系幹細胞の動員により、対象における疾患または病的状態を治療する方法：

(a) 配列番号：１のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) 配列番号：１のアミノ酸配列において１個～５個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

(c) 配列番号：１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔Ａ３〕

疾患または病的状態の治療が、炎症抑制治療、免疫調節治療、組織の再生誘導治療、および組織の線維化抑制治療から選択される、〔Ａ２〕に記載の方法。

〔Ａ４〕

疾患または病的状態が、炎症性疾患、自己免疫疾患、組織の損傷、虚血もしくは壊死を伴う疾患、および線維性疾患から選択される、〔Ａ２〕に記載の方法。

〔Ａ５〕

疾患または病的状態が、炎症性腸疾患である、〔Ａ２〕に記載の方法。

〔Ａ６〕

疾患または病的状態が、潰瘍性大腸炎である、〔Ａ２〕に記載の方法。

〔A 7〕

疾患または病的状態が、アトピー性皮膚炎である、〔A 2〕に記載の方法。

〔A 8〕

疾患または病的状態が、脳梗塞である、〔A 2〕に記載の方法。

〔A 9〕

以下から選択されるペプチドの有効量を対象に投与する工程を含む、炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎および脳梗塞から選択される対象における疾患を治療する方法：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；および

（c）配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔B 1〕

末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための、以下から選択されるペプチド：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；および

（c）配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミ

ノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔Ｂ２〕

末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療に用いるための、以下から選択されるペプチド：

（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド；

（ｂ）配列番号：１のアミノ酸配列において１個～５個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

（ｃ）配列番号：１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：１７または１９のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔Ｂ３〕

疾患または病的状態の治療が、炎症抑制治療、免疫調節治療、組織の再生誘導治療、および組織の線維化抑制治療から選択される、〔Ｂ２〕に記載のペプチド。

〔Ｂ４〕

疾患または病的状態が、炎症性疾患、自己免疫疾患、組織の損傷、虚血もしくは壊死を伴う疾患、および線維性疾患から選択される、〔Ｂ２〕に記載のペプチド。

〔Ｂ５〕

疾患または病的状態が、炎症性腸疾患である、〔Ｂ２〕に記載のペプチド。

〔Ｂ６〕

疾患または病的状態が、潰瘍性大腸炎である、〔Ｂ２〕に記載のペプチド。

〔B 7〕

疾患または病的状態が、アトピー性皮膚炎である、〔B 2〕に記載のペプチド。

〔B 8〕

疾患または病的状態が、脳梗塞である、〔B 2〕に記載のペプチド。

〔B 9〕

炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎および脳梗塞から選択される疾患の治療に用いるための、以下から選択されるペプチド：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

（c）配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔C 1〕

末梢血への間葉系幹細胞の動員のための医薬または試薬の製造における、以下から選択されるペプチドの使用：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

（c）配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17また

は 19 のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔C 2〕

末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療のための医薬の製造における、以下から選択されるペプチドの使用：

（a）配列番号：1 のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1 のアミノ酸配列において 1 個～5 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

（c）配列番号：1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド。

〔C 3〕

疾患または病的状態の治療が、炎症抑制治療、免疫調節治療、組織の再生誘導治療、および組織の線維化抑制治療から選択される、〔C 2〕に記載の使用。

〔C 4〕

疾患または病的状態が、炎症性疾患、自己免疫疾患、組織の損傷、虚血もしくは壊死を伴う疾患、および線維性疾患から選択される、〔C 2〕に記載の使用。

〔C 5〕

疾患または病的状態が、炎症性腸疾患である、〔C 2〕に記載の使用。

〔C 6〕

疾患または病的状態が、潰瘍性大腸炎である、〔C 2〕に記載の使用。

〔C 7〕

疾患または病的状態が、アトピー性皮膚炎である、〔C 2〕に記載の使用。
。

〔C 8〕

疾患または病的状態が、脳梗塞である、〔C 2〕に記載の使用。

〔C 9〕

炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎および脳梗塞から選択される疾患の治療のための医薬の製造における、以下から選択されるペプチドの使用：

（a）配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1個～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド；
および

（c）配列番号：1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号：17または19のアミノ酸配列を含むペプチド。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]生理食塩水、1% DMSO、またはペプチドの投与16時間後の末梢血を培養して得られたコロニーの数をプロットしたグラフである。グラフ中、「Saline」および「DMSO」が対照群、その他がペプチド投与群をそれぞれ示す。コロニー数は、マウス1匹から採取した末梢血量（800 μ L）あたりの値として示した。エラーバーにおいて、長い横棒が平均値、短い横棒が標準偏差を表す。点線は、活性の有無を判定するための閾値（コロニー数：10個）を表す。

[図2]生理食塩水またはペプチドの投与16時間後の末梢血を培養して得られたコロニーの数をプロットしたグラフである。グラフ中、「Saline」が対照群、その他がペプチド投与群をそれぞれ示す。コロニー数は、マウス1匹から採取した末梢血量（800 μ L）あたりの値として示した。エラーバーにおいて、長い横棒が平均値、短い横棒が標準偏差を表す。点線は、活性の有無を判定するための閾値（コロニー数：10個）を表す。

[図3]マウスの体重変化を示すグラフである（平均±標準誤差（SEM）；* $p < 0.05$ （Student's *t* test））。グラフ中、「saline」が対照群、「1r10」がペプチド1r10投与群をそれぞれ示す。横軸はデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液の飲水開始後の日数を示す。

[図4]マウスの便スコアを示すグラフである（平均±標準誤差（SEM））。グラフ中、「saline」が対照群、「1r10」がペプチド1r10投与群をそれぞれ示す。横軸はデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液の飲水開始後の日数を示す。

[図5]マウスのDAIスコアを示すグラフである（平均±標準誤差（SEM）；* $p < 0.05$ （Mann Whitney U test））。グラフ中、「saline」が対照群、「1r10」がペプチド1r10投与群をそれぞれ示す。横軸はデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液の飲水開始後の日数を示す。

[図6]デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液の飲水開始10日後の大腸長を示すグラフである（平均±標準誤差（SEM））。グラフ中、「saline」が対照群、「1r10」がペプチド1r10投与群をそれぞれ示す。

[図7]ペプチドの投与開始4日後におけるマウスの耳介部を示す写真である。矢印は落屑の見られやすい耳介辺縁部を示す。

[図8]ペプチド投与期間中の耳介厚の推移を示すグラフである（縦軸はペプチド投与開始日を100%とする相対値）。各ポイントは平均値と標準誤差を示す（* $p < 0.05$; Repeated one way ANOVA test; post hoc Tukey-Kramer test）。

[図9]ペプチド投与開始後4日目の耳介部皮膚切片のH.E.染色像を示す代表写真である。写真内の矢印は測定した真皮厚の例を示す。

[図10]ペプチド投与開始後4日目における各群の真皮厚を示すグラフ（Box-Whisker plot）である。中央のBoxおよびWhiskerは、それぞれ中央値と四分位数および最大値/最小値を示す。Box内のDiamondは平均値を示す。（** $p < 0.01$ Mann Whitney U-test; 各群マウス7匹 x マウスあたり9測定値。）

[図11]ペプチド投与開始後4日目における耳介部皮膚切片の多重蛍光免疫染色像を示す写真である（Laminin(緑)-CD45(赤)-DAPI(青)）。Lamininは組織内

構造(血管・基底膜・神経)を標識するために用い、DAPIは各細胞のDNAに対するcounterstainとして用いた。

[図12]ペプチド投与開始後4日目の耳介部皮膚切片における、各群の高倍率視野(HPF:High power field (400x))単位面積あたりの、CD45陽性細胞(CD45 + immune cells)の数を示すグラフである(Box-Whisker plot)。中央のBoxおよびWhiskerは、それぞれ中央値と四分位数および最大値/最小値を示す。Box内のDiamondは平均値を示す。xは外れ値(outlier)を表す。(** $p < 0.01$ Mann-Whitney U-test; 各群マウス7匹 x マウスあたり9測定値。なお、対照群およびペプチド投与群のいずれにおいても、外れ値が全7個体中1個体(約14%)に出現したため、各群について外れ値を有さない他の6個体での平均値を代入する処理を行った。)

[図13]右MCA閉塞48時間後における脳梗塞巣体積率を示すグラフである(平均値±標準誤差)。** $p < 0.01$ 、Mann-WhitneyのU検定。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明者らはこれまでに、生体内の幹細胞を活性化あるいは末梢循環を介して損傷組織へ動員する作用を持った物質を見出しており、当該物質は細胞治療の弱点を克服できる新しいタイプの医薬として有望であると考えている。具体的には、本発明者らは、壊死組織から放出されるHigh mobility group box 1(HMGB1)が、生体内で組織再生を誘導する役割を担うPlatelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α)陽性細胞(間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)と考えられる)を、末梢循環を介して壊死組織に動員することにより、壊死組織の炎症を抑制し、組織再生を促進することを見出している。また、本発明者らは、HMGB1の断片ペプチドが間葉系幹細胞の末梢血動員活性および組織再生誘導活性を示すことも見出している。今回、本発明者らは、先に見出した人工配列ペプチド「1r10」の部分配列からなるペプチド(以下、「1r10断片ペプチド」とも称する)を複数合成し、MSC血中動員活性の有無を調べた結果、特定のアミノ酸配列を含む1r10断片ペプチドが当該活性を示すこと、および、ペプチド1r10のN末端側およびC末端側に1箇所ず

つMSC血中動員活性を示すコア領域が存在することが判明した。

- [0010] 間葉系幹細胞が、抗炎症作用、免疫調節作用、抗線維化作用を発揮することは当業者には周知である。また、間葉系幹細胞は、種々の組織に分化できる多能性も有していることから、損傷組織の再生促進作用を発揮することもまた当業者には周知である。そのため、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を持つ1r10断片ペプチド、または、該断片ペプチドのアミノ酸配列を含む、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を持つペプチドを対象に投与すると、末梢血中に間葉系幹細胞が動員され、当該間葉系幹細胞の抗炎症作用、免疫調節作用、抗線維化作用、組織再生促進作用（間葉系幹細胞の分化および／または炎症抑制作用による）によって、種々の疾患に対する治療効果もたらされることが考えられる。
- [0011] 本発明者らが先に見出した人工配列ペプチド1r10は、炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎、および脳梗塞に対して治療効果を示すが、これは間葉系幹細胞の末梢血中への動員を介してもたらされる効果であると考えられる。したがって、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を持つ1r10断片ペプチド、または、該断片ペプチドのアミノ酸配列を含む、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を持つペプチドは、人工配列ペプチド1r10と同様に炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎、および脳梗塞に対して治療効果を示すと考えられる。
- [0012] 本願において、「人工配列ペプチド」とは、天然には存在しないアミノ酸配列を有するペプチドをいう。また、本願においては「人工配列ペプチド」を単に「人工ペプチド」とも称する。
- [0013] 本願において、「1r10断片ペプチド」とは、人工配列ペプチド1r10のアミノ酸配列（配列番号：1）の一部からなるペプチドをいう。
- [0014] 本願は、特定の1r10断片ペプチドまたは該断片ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを含有する、末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物を提供する。
- [0015] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物は、医薬組成

物または試薬組成物として利用できる。本願において、「医薬組成物」という用語は、「医薬」、「薬剤」または「薬学的組成物」と互換的に用いられ、「試薬組成物」という用語は、「試薬」と互換的に用いられる。

[0016] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物は、例えば末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療に用いることができる。

[0017] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物を利用して末梢血中に動員させた間葉系幹細胞を体外へ回収後、濃縮して、対象における疾患または病的状態の治療に用いることも可能である。本願は、間葉系幹細胞を体外へ回収するための医薬または試薬の製造における、特定の1r10断片ペプチドまたは該断片ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドの使用もまた提供する。

[0018] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物は、例えば基礎研究、臨床研究等にも用いることができる。基礎研究および臨床研究としては、例えば試験管内での間葉系幹細胞の動員研究、実験動物での間葉系幹細胞の動員研究などが挙げられるが、これらに制限されない。本願は、基礎研究または臨床研究のための医薬または試薬の製造における、特定の1r10断片ペプチドまたは該断片ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド（これらペプチドを、以下、単に「ペプチド」とも称する）の使用もまた提供する。

[0019] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員に用いるための組成物には、1もしくは複数のペプチドを含めることができる。

[0020] 本願において、「間葉系幹細胞」とは、骨、軟骨、脂肪、筋肉等の間葉系の組織／細胞への分化能と、自己複製能とを有する細胞である。一つの態様において、間葉系幹細胞は、上皮系組織や神経組織への分化能をも有する。自己複製能を有する間葉系幹細胞は、例えばコロニー形成能を有することを指標として判別することができる。一つの態様において、間葉系幹細胞は、コロニー形成能を有する細胞である。間葉系幹細胞は、骨髄またはその他の組織（血液、例えば臍帯血、および皮膚、脂肪、歯髄等）から採取すること

ができ、固相、例えば培養皿への付着細胞として培養・増殖可能である。本願における間葉系幹細胞は、狭義の幹細胞（自己複製能と分化能を有する細胞）のみならず前駆細胞をも含む不均一な細胞集団として存在してもよく、培養条件下では狭義の幹細胞、または狭義の幹細胞および前駆細胞に加えて分化した細胞をも含み得る。一つの態様において、間葉系幹細胞は狭義の幹細胞のみによって構成されていてもよい。

[0021] 本願において、前駆細胞は、血液系以外の特定組織細胞への一方向性分化能を持つ細胞と定義され、間葉系組織、上皮系組織、神経組織、実質臓器、血管内皮への分化能を有する細胞を含む。

[0022] 本願において、間葉系幹細胞としては、骨髓間葉系幹細胞および骨髓由来間葉系幹細胞も挙げられるが、これに制限されない。「骨髓間葉系幹細胞」とは、骨髓内に存在する間葉系幹細胞である。一つの態様において、骨髓間葉系幹細胞は、上皮系組織や神経組織への分化能をも有する。一つの態様において、骨髓間葉系幹細胞は、コロニー形成能を有する細胞である。本願において、「骨髓間葉系幹細胞」という用語は、「骨髓間葉系間質細胞」、「骨髓多能性幹細胞」または「骨髓多能性間質細胞」と互換的に用いられる。

[0023] また、「骨髓由来間葉系幹細胞」とは、骨髓から骨髓外に動員された間葉系幹細胞をいう。骨髓由来間葉系幹細胞は、末梢血採血、さらには脂肪などの間葉系組織、皮膚などの上皮組織、脳などの神経組織からの採取によって取得することができる。本願において、「骨髓由来間葉系幹細胞」という用語は、「骨髓由来間葉系間質細胞」、「骨髓由来多能性幹細胞」または「骨髓由来多能性間質細胞」と互換的に用いられる。

[0024] 一つの態様において、骨髓間葉系幹細胞および骨髓由来間葉系幹細胞は、採取後直接、あるいは一度培養皿へ付着させた細胞を生体の損傷部に投与することにより、例えば皮膚を構成するケラチノサイトなどの上皮系組織、脳を構成する神経系の組織への分化能をも有し得る。

[0025] 骨髓間葉系幹細胞および骨髓由来間葉系幹細胞は、骨芽細胞（分化を誘導するとカルシウムの沈着を認めること等で特定可能）、軟骨細胞（アルシア

ンブルー染色陽性、サフラニン-O染色陽性等で特定可能)、脂肪細胞(ズダンIII染色陽性等で特定可能)の他に、例えば線維芽細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ストローマ細胞、腱細胞などの間葉系細胞、神経細胞、色素細胞、表皮細胞、毛包細胞(サイトケラチンファミリー、ヘアケラチンファミリー等を発現する)、上皮系細胞(たとえば表皮角化細胞、腸管上皮細胞はサイトケラチンファミリー等を発現する)、内皮細胞、さらに肝臓、腎臓、脾臓等の実質臓器細胞に分化する能力を有し得るが、分化後の細胞は上記細胞に限定されるものではない。

[0026] ヒト間葉系幹細胞のマーカーとしては、PDGFR α 陽性、PDGFR β 陽性、Lin陰性、CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性、CD29陽性、Flk-1陰性、CD105陽性、CD73陽性、CD90陽性、CD71陽性、Stro-1陽性、CD106陽性、CD166陽性、CD31陰性、CD271陽性、CD11b陰性の全部または一部が例示できるが、これらに制限されるものではない。

[0027] マウス間葉系幹細胞のマーカーとしては、CD44陽性、PDGFR α 陽性、PDGFR β 陽性、CD45陰性、Lin陰性、Sca-1陽性、c-kit陰性、CD90陽性、CD105陽性、CD29陽性、Flk-1陰性、CD271陽性、CD11b陰性の全部または一部が例示できるが、これらに制限されるものではない。

[0028] ラット間葉系幹細胞のマーカーとしては、PDGFR α 陽性、CD44陽性、CD54陽性、CD73陽性、CD90陽性、CD105陽性、CD29陽性、CD271陽性、CD31陰性、CD45陰性の全部または一部が例示できるが、これらに制限されるものではない。

[0029] 本願において、間葉系幹細胞としては、PDGFR α 陽性の間葉系幹細胞、PDGFR α 陽性の骨髓由来間葉系幹細胞、PDGFR α 陽性の骨髓由来細胞であって、骨髓採取(骨髓細胞採取)または末梢血採血により得られた血液中の単核球分画細胞培養により、付着細胞として得られる細胞などが例示できるが、これらに制限されるものではない。PDGFR α 陽性の間葉系幹細胞の例としては、PDGFR α およびCD44が陽性である細胞、PDGFR α およびCD90が陽性である細胞、PDGFR α およびCD105が陽性である細胞、PDGFR α およびCD29が陽性である細胞等が挙げられる。一つの態様において、PDGFR α 陽性の間葉系幹細胞は、CD44

が陰性の細胞であってもよい。

[0030] 本願は、特定の1r10断片ペプチドまたは該断片ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを含有する、末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療に用いるための組成物を提供する。

[0031] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療に用いるための組成物は医薬組成物として利用できる。

[0032] 本願における対象としては、特に制限はなく、哺乳類、鳥類、魚類等が挙げられる。哺乳類としては、ヒト又は非ヒト動物が挙げられ、例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ウマ、ヒツジ、クジラなどが例示できるが、これらに限定されるものではない。本願において、「対象」という用語は、「患者」、「個体」または「動物」と互換的に用いられる。

[0033] 本願の末梢血への間葉系幹細胞の動員による、対象における疾患または病的状態の治療に用いるための組成物には、1もしくは複数のペプチドを含めることができる。

[0034] 本願において、疾患または病的状態の治療は、例えば炎症抑制治療、免疫調節治療、組織の再生誘導治療、および組織の線維化抑制治療から選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0035] 本願において、疾患または病的状態は、例えば炎症性疾患、自己免疫疾患、組織の損傷、虚血もしくは壊死を伴う疾患、および線維性疾患から選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0036] 本願において、炎症性疾患としては、例えば炎症性腸疾患およびアトピー性皮膚炎が挙げられるが、これらに限定されるものではない。自己免疫疾患としては、例えば炎症性腸疾患が挙げられるが、これに限定されるものではない。線維性疾患としては、例えば肺線維症が挙げられるが、これに限定されるものではない。組織の損傷、虚血または壊死を伴う疾患としては、例えば炎症性腸疾患および脳梗塞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。炎症性腸疾患としては、潰瘍性大腸炎およびクローン病が挙げられる

が、これらに限定されるものではない。

- [0037] 本願において、「間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性」という用語は、「末梢血中における間葉系幹細胞の存在量を増大させる活性」および「MSC血中動員活性」と互換的に用いられる。
- [0038] 本願におけるペプチドのMSC血中動員活性は、例えば、i)ペプチドを投与した個体、および、ペプチドを投与していない個体から末梢血を回収し、culture dishに播種して培養し（数日～10日）、形成されたコロニーの数をカウントすること、および、ii)当該コロニーを形成した細胞が、固相への付着性を有し、且つ、骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能を有することを確認することによって、評価することができる。上記i)においては、回収した末梢血をculture dishに播種する前に、所望の方法により当該末梢血から赤血球を除去してもよい。上記ii)においては、分化能の確認に代えて、コロニーを形成した細胞について表面マーカー解析やトランスクリプトーム解析等を行い、当該細胞が間葉系幹細胞に特徴的な性質を有していることを確認してもよい。
- [0039] 本願におけるペプチドは、それをコードするDNAを適当な発現系に組み込んで遺伝子組換え体（recombinant）として得ることができるし、または、人工的に合成することもできる。よって、本願におけるペプチドには、細胞を用いて製造されたペプチド、および、人工的に合成されたペプチド（いわゆるsynthetic peptide）も含まれる。
- [0040] 本願におけるペプチドを遺伝子工学的な手法によって得るためには、該ペプチドをコードするDNAを適当な発現系に組み込んで発現させればよい。
- [0041] 本願に応用可能な宿主としては、原核生物の細胞、真核生物の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。また、本願に応用可能な宿主としては、細菌（例えば大腸菌）、酵母、動物細胞（例えばHEK293細胞やCHO細胞などの哺乳動物細胞、カイコ細胞などの昆虫細胞）、植物細胞などもまた挙げられるが、これらに制限されない。
- [0042] 本願に応用可能な宿主／ベクター系としては、例えば、発現ベクターpGE

Xと大腸菌を示すことができる。pGEXは外来遺伝子をグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させることができる (Gene, 67:31-40, 1988) ので、本願のペプチドをコードするDNAを組み込んだpGEXをヒートショックでBL21のような大腸菌株に導入し、適当な培養時間の後に isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) を添加してGST融合ペプチドの発現を誘導する。本願におけるGSTはグルタチオンセファロース4Bに吸着するため、発現生成物はアフィニティークロマトグラフィーによって容易に分離・精製することが可能である。

[0043] 本願のペプチドの遺伝子組換え体を得るためのホスト／ベクター系としては、この他にも次のようなものを応用することができる。まず細菌をホストに利用する場合には、タグ等を利用した融合タンパク質の発現用ベクターが市販されている。また、本願の遺伝子組換え体には、タグやその一部のペプチドが付加した状態のものも含まれる。

[0044] 本願のペプチドに付加されるタグとしては、本願のペプチドの活性に影響しない限り、特に制限はなく、例えば、ヒスチジンタグ (例えば6×His、10×His)、HAタグ、FLAGタグ、GSTタグ、T7-タグ、HSV-タグ、E-タグ、Ickタグ、B-タグなどが挙げられる。

[0045] 酵母では、Pichia属酵母が糖鎖を備えたタンパク質の発現に有効なことが公知である。糖鎖の付加という点では、昆虫細胞をホストとするバキュロウイルスベクターを利用した発現系も有用である (Bio/Technology, 6:47-55, 1988)。更に、哺乳動物の細胞を利用して、CMV、RSV、あるいはSV40等のプロモーターを利用したベクターのトランスフェクションが行われており、これらのホスト／ベクター系は、いずれも本願のペプチドの発現系として利用することができる。また、プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター、センダイウイルスエンベロープベクター、パピローマウイルスベクター等のウイルスベクターを利用して遺伝子を導入することもできるが、これらに限定されるものではない。該ベクターには

、遺伝子発現を効果的に誘導するプロモーターDNA配列や、遺伝子発現を制御する因子、DNAの安定性を維持するために必要な分子が含まれてもよい。

- [0046] 得られた本願のペプチドは、宿主細胞内または細胞外（培地など）から分離し、実質的に純粋で均一なペプチドとして精製することができる。ペプチドの分離、精製は、通常のペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればペプチドを分離、精製することができる。
- [0047] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Marshak et al., *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Ed Daniel R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。
- [0048] また、本願のペプチドは、実質的に精製されたペプチドであることが好ましい。ここで「実質的に精製された」とは、本願のペプチドの精製度（タンパク質成分全体における本願のペプチドの割合）が、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、100%若しくは100%に近いことを意味する。100%に近い上限は当業者の精製技術や分析技術に依存するが、例えば、99.999%、99.99%、99.9%、99%などである。
- [0049] また、上記の精製度を有するものであれば、如何なる精製方法によって精製されたものでも、実質的に精製されたペプチドに含まれる。例えば、上述のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、または組み合わせることにより、実

質的に精製されたペプチドを例示できるが、これらに限定されるものではない。

[0050] 一方、本願のペプチドを人工的に合成することも出来る。本願におけるペプチド合成法では、ペプチド液相合成法およびペプチド固相合成法等の方法によってペプチドを化学合成することができる。ペプチド固相合成法はペプチドを化学的に合成する際に、一般的に用いられる方法のひとつである。表面をアミノ基で修飾した直径0.1mm程度のポリスチレン高分子ゲルのビーズなどを固相として用い、ここから脱水反応によって1つずつアミノ酸鎖を伸長していく。目的とするペプチドの配列が出来上がったら固相表面から切り出し、目的の物質を得る。固相合成法により、バクテリア中で合成させることの難しいリボソームペプチドの合成や、D体や安定同位元素 (^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 等) 置換体などの非天然アミノ酸の導入、重原子置換体 (例えばセレノメチオニンなどのセレノアミノ酸) の導入、ペプチド及びタンパク質主鎖の修飾なども可能である。固相法において70から100個を超える長いペプチド鎖を合成する場合、ネイティブケミカルライゲーション法を用いて、2つのペプチド鎖を結合させる事により合成することが可能である。本願のペプチドは、該ペプチドの医薬上許容される塩の形態であってもよい。医薬上許容される塩としては、塩酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本願のペプチドは、該ペプチドの溶媒和物、または、該ペプチドの医薬上許容される塩の溶媒和物の形態であってもよい。溶媒和物とは、溶質分子に任意の数の溶媒分子が配位しているものをいい、例えば水和物が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0051] 本願における1r10断片ペプチドのアミノ酸長は、例えば11~29アミノ酸の範囲、例えば11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29アミノ酸であり得る。

[0052] 本願において、1r10断片ペプチドとしては、例えば以下から選択されるペプチドが挙げられる：

(1) 配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号：1

7 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド；

(2) 配列番号：1 の 1 番目から 27 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N03； 配列番号：2) ；

(3) 配列番号：1 の 1 番目から 26 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N04； 配列番号：3) ；

(4) 配列番号：1 の 1 番目から 25 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N05； 配列番号：4) ；

(5) 配列番号：1 の 1 番目から 24 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N06； 配列番号：5) ；

(6) 配列番号：1 の 1 番目から 23 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N07； 配列番号：6) ；

(7) 配列番号：1 の 1 番目から 19 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N11； 配列番号：7) ；

(8) 配列番号：1 の 1 番目から 18 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N12； 配列番号：8) ；

(9) 配列番号：1 の 1 番目から 16 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_N14； 配列番号：9) ；

(10) 配列番号：1 の 6 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_C05； 配列番号：11) ；

(11) 配列番号：1 の 11 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_C10； 配列番号：12) ；

(12) 配列番号：1 の 12 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_C11； 配列番号：13) ；

(13) 配列番号：1 の 13 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_C12； 配列番号：14) ；

(14) 配列番号：1 の 16 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_C15； 配列番号：15) ；

(15) 配列番号：1 の 17 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペ

プチド (1r10_C16 ; 配列番号 : 16) ;

(16) 配列番号 : 1 の 18 番目から 30 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_C17 ; 配列番号 : 17) ; および

(17) 配列番号 : 1 の 6 番目から 16 番目のアミノ酸配列からなるペプチド (1r10_MF5 ; 配列番号 : 19) 。

[0053] 上記 (1) ~ (17) に記載のアミノ酸配列のうち、上記 (16) に記載の「配列番号 : 1 の 18 番目から 30 番目のアミノ酸配列」(配列番号 : 17 のアミノ酸配列) および上記 (17) に記載の「配列番号 : 1 の 6 番目から 16 番目のアミノ酸配列」(配列番号 : 19 のアミノ酸配列) は、1r10 断片ペプチドが MSC 血中動員活性を保持するために重要なコア領域である。1r10 断片ペプチドが当該 2 つのコア領域の少なくとも一方を含んでいれば、MSC 血中動員活性は保持される。

[0054] 上記 (1) に記載の「配列番号 : 1 のアミノ酸配列の一部からなり、且つ、配列番号 : 17 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド」における「配列番号 : 1 のアミノ酸配列の一部」としては、上記 (2) ~ (15) のいずれかに記載のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0055] 本願のペプチドとしては、以下から選択されるペプチドも挙げられる :

(i) 配列番号 : 1 のアミノ酸配列において 1 個 ~ 5 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号 : 17 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド ; および

(ii) 配列番号 : 1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドであって、配列番号 : 17 または 19 のアミノ酸配列を含むペプチド。

このようなペプチドは、当業者に周知の方法で製造できる。

[0056] 上記 (i) および (ii) より選択されるペプチドは、例えば 30 個以下、29 個以下、28 個以下、27 個以下、26 個以下、25 個以下、24 個以下

、23個以下、22個以下、21個以下、20個以下、19個以下、18個以下、17個以下、16個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下、または11個以下のアミノ酸からなるペプチドであり得る。上記(i)および(ii)より選択されるペプチドは、配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチドを除くペプチドであり得る。

[0057] 上記(i)に記載のペプチドに関して、「1個～5個」としては、例えば5個、4個、3個、2個、1個、1個～5個、1個～4個、1個～3個、または1個若しくは2個が挙げられる。

[0058] 上記(ii)に記載のペプチドに関して、「90%以上」は「90%以上100%未満」として表現することもでき、「90%以上」としては、例えば90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上が挙げられる。

[0059] 上記(1)から(17)より選択される1r10断片ペプチドは、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を有する1r10断片ペプチドである。上記(i)および(ii)より選択されるペプチドもまた間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を有するペプチドである。よって、これらペプチドは、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する効果、ならびに炎症性疾患、自己免疫疾患、組織の損傷、虚血または壊死を伴う疾患、および線維性疾患の治療効果を有すると考えられる。

[0060] 本願は、本明細書に開示したペプチド、例えば、上記(1)から(17)より選択される1r10断片ペプチド、および、上記(i)および(ii)より選択されるペプチドもまた提供する。

[0061] 配列番号：1に記載のアミノ酸配列は、本願の人工配列ペプチド1r10のアミノ酸配列である。配列番号：2～19に記載のアミノ酸配列は、本願の1r10断片ペプチドのアミノ酸配列である。配列番号：1に記載のアミノ酸配列(1r10のアミノ酸配列)において1r10断片ペプチドのアミノ酸配列に対応する領域を以下の表1に示す。

[0062] 配列番号：20に記載の塩基配列は、本願の人工配列ペプチド1r10をコー

ドするDNAの塩基配列の例である。配列番号：21および22に記載の塩基配列は、それぞれ、本願の1r10断片ペプチドである1r10_C17および1r10_MF5をコードするDNAの塩基配列の例である。配列番号：20に記載の塩基配列（例示された1r10の塩基配列）において1r10断片ペプチドをコードするDNAの塩基配列に対応する領域を以下の表1に示す。

[0063] [表1]

ペプチドの名称	1r10のアミノ酸配列 において対応する領域	例示された1r10の塩基配列 において対応する領域
1r10	1-30	1-90
1r10_N03	1-27	1-81
1r10_N04	1-26	1-78
1r10_N05	1-25	1-75
1r10_N06	1-24	1-72
1r10_N07	1-23	1-69
1r10_N11	1-19	1-57
1r10_N12	1-18	1-54
1r10_N14	1-16	1-48
1r10_N15	1-15	1-45
1r10_C05	6-30	16-90
1r10_C10	11-30	31-90
1r10_C11	12-30	34-90
1r10_C12	13-30	37-90
1r10_C15	16-30	46-90
1r10_C16	17-30	49-90
1r10_C17	18-30	52-90
1r10_C18	19-30	55-90
1r10_MF5	6-16	16-48

[0064] 本願の人工配列ペプチド1r10または1r10断片ペプチドをコードするDNAの塩基配列の他の例は、当業者には自明である。当該DNAは、当業者に公知のコドン表を用いて、人工配列ペプチド1r10または1r10断片ペプチドのアミノ酸残基を対応するコドンに変換する方法（逆翻訳）によって作成することができる。逆翻訳は、所望により、アミノ酸および核酸配列の解析用に開発されて

いる種々のソフトウェア（プログラム、アルゴリズム等を含む）を利用して行うことができる。

[0065] 本願のペプチド、または、それを含有する医薬組成物（以下、「医薬組成物等」と称する）の有効量が、本明細書に記載の疾患や症状の治療のために対象に投与される。

[0066] 本願における有効量とは、本明細書に記載の疾患または病的状態の治療に十分な量をいう。本願における治療には、軽減、遅延、阻止、改善、寛解、治癒、完治などが含まれるが、これらに限定されない。

[0067] 本願の医薬組成物等の投与部位に制限はなく、疾患または病的状態の症状が現れる部位もしくはその近傍、それらとは異なる部位（それら以外の部位）、疾患または病的状態の症状が現れる部位から離れた部位、疾患または病的状態の症状が現れる部位から遠位にある部位、または、疾患または病的状態の症状が現れる部位に対して遠位かつ異所である部位など、いかなる部位に投与されても、本願の医薬組成物等は、その効果を発揮することができる。

[0068] また本願の医薬組成物等は、疾患または病的状態の症状が現れる組織とは異なる組織、疾患または病的状態の症状が現れる組織から離れた組織、疾患または病的状態の症状が現れる組織から遠位にある組織、または、疾患または病的状態の症状が現れる組織に対して遠位かつ異所にある組織など、いかなる組織に投与されても、その効果を発揮することができる。

[0069] 本願の医薬組成物等の投与方法としては、経口投与または非経口投与が挙げられ、非経口投与方法としては、血管内投与（動脈内投与、静脈内投与等）、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられるが、これらに限定されない。また、本願の医薬組成物等を、注射投与、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって全身または局部的（例えば、皮下、皮内、皮膚表面、眼球あるいは眼瞼結膜、鼻腔粘膜、口腔内および消化管粘膜、膣・子宮内粘膜、または損傷部位など）に投与できる。

- [0070] また、本願のペプチドに代えて、該ペプチドを分泌する細胞、該ペプチドをコードするDNAが挿入された遺伝子治療用ベクター、およびこれらを含有する医薬組成物を用いることもできる。
- [0071] また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本願の医薬組成物等を投与する場合、例えば、一回の投与につき、体重1 kgあたり0.0000001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.00001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。本願のペプチドを分泌する細胞や該ペプチドをコードするDNAが挿入された遺伝子治療用ベクターを投与する場合も、該ペプチドの量が上記範囲内となるように投与することができる。しかしながら、本願における医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。
- [0072] 本願の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着色料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。
- [0073] なお、本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。
- [0074] 本発明は、下記の実施例によってさらに例示されるが、それらに限定されるものではない。

実施例

[0075] 実施例 1

1r10断片ペプチドによる間葉系幹細胞の動員

[0076] (1) 材料および方法

i) ペプチドの製造

以下の表に示すペプチド（1r10および1r10断片ペプチド）を、固相法により化学的に合成した（得られたペプチドは、いずれもトリフルオロ酢酸（TFA）塩の形態である）。

[0077] [表2]

ペプチドの名称	配列番号
1r10	1
1r10_N03	2
1r10_N04	3
1r10_N05	4
1r10_N06	5
1r10_N07	6
1r10_N11	7
1r10_N12	8
1r10_N14	9
1r10_N15	10
1r10_C05	11
1r10_C10	12
1r10_C11	13
1r10_C12	14
1r10_C15	15
1r10_C16	16
1r10_C17	17
1r10_C18	18
1r10_MF5	19

[0078] i i) ペプチドの投与

C57BL/6Jマウス（8週齢、雄、体重25g）を用意し、前出の表に記載の各ペプチドを投与する群と対照群に分けた。ペプチドの投与は、生理食塩水また

は1% DMSOを溶媒として1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度に調整した各ペプチドの溶液を100 μL ／匹の量（ペプチドの投与量としては4mg/kg）で尾静脈に注入することにより行った（1r10_N14および1r10_N15の溶媒は1% DMSO、それ以外のペプチドの溶媒は生理食塩水である）。対照群には、生理食塩水または1% DMSOを100 μL ／匹の量で尾静脈に注入した。

[0079] i i i) 末梢血からの細胞回収

生理食塩水もしくは1% DMSOまたはペプチドの投与から16時間後に、全身麻酔下で心臓から末梢血をマウス1匹あたり800 μL 採取した（ヘパリンを含有する1 mLシリンジを使用）。各々のペプチド投与群および対照群につき、3匹のマウスから採取した末梢血をプールし、赤血球を除去するため、採取した血液と等量のHetasep（STEMCELL Technologies社、Cat No. ST-07906）を加え、100Gで2分間遠心し、室温で15分間インキュベートした後、上清を回収した。当該上清を、末梢血中の有核細胞を含むサンプルとして次の実験に供した。

[0080] i v) コロニーアッセイ

上記の手順によって得た上清（末梢血由来細胞含有サンプル）を、コラーゲンIでコートされた6ウェルプレート（Corning社、Cat No. 356400）に播種し、MesenCult Expansion Kit（STEMCELL Technologies社、Cat No. ST-0551 3）を利用して当該キットのマニュアル通りに調製したExpansion Mediumに1% L-glutamine（ナカライテスク社）、10 μM ROCK inhibitor（Y27632、Tocris Bioscience社）および1% ペニシリン／ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含有させた培地（数値はいずれも終濃度）を用いて、37°C、5%CO₂、5%O₂の条件下で10日間培養した。培養期間中は1週間に2回、培地を新鮮なものに交換した。培養10日目に、Differential Quik Stain Kit（シスメックス株式会社、Cat No. 16920）を用いてプレート上の細胞を染色し、50個以上の細胞を含むコロニーの数をカウントした。

[0081] 本発明者らがこれまでに行った実験において、末梢血をディッシュやプレート等の固相上で培養した結果得られるコロニーは全て、固相への付着性と

自己複製能を有することに加えて、PDGFR α 陽性であり、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、および上皮系細胞への分化能を有することが確認できている。

[0082] また、間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を有するヒトHMGB1タンパク質のアミノ酸残基1-44からなるペプチド（以下、HMGB1ペプチド1-44）を投与した後の末梢血を固相上で培養した結果得られるコロニーも全て、固相への付着性と自己複製能を有し、PDGFR α 陽性であることが確認できており、かつ、トランスクリプトーム解析のデータをクラスタリングし、gene ontology解析を行った結果から、間葉系幹細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを有することが確認できている。

[0083] さらに、生理食塩水投与後の末梢血よりも、HMGB1ペプチド1-44を投与した後の末梢血の方が、固相培養で得られるコロニーの数が多いことも確認済みである。

[0084] したがって、末梢血を固相上で培養した結果得られるコロニーは間葉系幹細胞であり、末梢血の固相培養で検出されるコロニー数の増加は、末梢血中の間葉系幹細胞数の増加を示すと考えられる。

[0085] また、通常、間葉系幹細胞は末梢血中にはほとんど存在しないため、増加した分の間葉系幹細胞は末梢血以外の組織（例えば骨髄）から末梢血中に動員されたものと考えられる。

[0086] 以上のことから、被験物質投与後の末梢血の固相培養で検出されるコロニーの数は、当該被験物質が間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性の指標として用いることができる。

[0087] 被験物質の投与後、末梢血中の間葉系幹細胞数が最大になるタイミング（ピークタイム）は、個体ごとにばらつきがあると考えられ、上記の末梢血コロニーアッセイでは、採血のタイミング（1r10およびその断片ペプチドの場合、被検物質投与後16時間）と末梢血中の間葉系幹細胞数のピークタイムが一致しないケースがしばしば起こり得る。そのため、複数回のアッセイ結果の平均ではなく、1回でも所定の閾値を超える数のコロニー形成をもたらした被検物質はMSC血中動員活性ありと評価することとした。

[0088] また、本発明者らがこれまでに行った多数回のコロニーアッセイの結果から、陰性対照（生理食塩水または1% DMSO投与群）では何度アッセイしても形成されるコロニー数は「10個未満」であることが確認できている。そこで、本実施例においては、閾値となるコロニー数を「10個」に設定し、アッセイを4～6回実施したうち1回でも「10個以上」のコロニー形成をもたらした被検物質を、MSC血中動員活性を有する物質と判定した。

[0089] (2) 結果

表2に記載のペプチドについて4～6回アッセイを実施した結果、N末端側の断片ペプチドについては、1r10_N03～N07、N11～12、N14およびMF5を投与した群で10個以上のコロニーが形成され、1r10_N15を投与した群のコロニー形成数は10個未満であった（図1）。また、C末端側の断片ペプチドについては、1r10_C05、C10～12およびC15～C17を投与した群で10個以上のコロニーが形成され、1r10_C18を投与した群のコロニー形成数は10個未満であった（図2）。これらの結果から、1r10_MF5と1r10_C17のアミノ酸配列が、MSC血中動員活性を保持するために重要なコア配列であることが示された。

[0090] 参考例1

炎症性腸疾患に対する人工配列ペプチド1r10の有効性

[0091] (1) 材料および方法

i) 薬剤

デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）（分子量36,000～50,000、MP Biomedicals社製、製品番号160110）を精製水に溶解し、2.5%(w/v)のDSS水溶液を調製した。また、配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチド1r10（TFA塩）を固相法により化学合成し、被験物質として用いた。

[0092] ii) 炎症性腸疾患（IBD）モデルマウスの作成

BALB/cマウス（9週齢、オス）に2.5% DSS水溶液を7日間自由飲水させ、大腸炎を誘発した。その後、DSSから水道水の飲水に変更し、3日後（DSS水溶液の飲水開始10日後）に大腸採取を行った。

[0093] iii) ペプチドの投与

上記の通り作成したIBDモデルマウスをペプチド1r10投与群 (n=8) および対照群 (n=8) に分けた。ペプチドの投与は、DSS水溶液の飲水開始後1、4、7、8および9日目に、生理食塩水を溶媒として0.5mg/mLの濃度に調整したペプチド1r10の溶液を10 mL/kgの量 (ペプチドの投与量としては5mg/kg) で尾静脈に注入することにより行った。対照群には、DSS水溶液の飲水開始後1、4、7、8および9日目に、生理食塩水を10 mL/kgの量で尾静脈に注入した。

[0094] i v) ペプチドの投与による効果の評価

DSS水溶液の飲水開始から10日間、土曜・日曜・祝日を除いて毎日、マウスの体重測定と症状 (便の状態、および出血) の観察を行い、DAI (disease activity index) スコアを算出して症状の程度を評価した。DAIスコアは、体重減少率、便の状態、および便出血を下記表の通りにスコア付けし、これら3項目のスコアを合計することにより算出した。スコア付けの基準は、Liらの方法 (PLoS One, 2015 Dec 7; 10(12):e0144101) を一部参考にした。

[0095]

[表3]

DAI (disease activity index) のスコア付け

	項目	スコア
体重減少率	減少なし	0
	1-5%	1
	5-10%	2
	10-20%	3
	>20%	4
便の状態	正常	0
	軟便	2
	下痢・水様便	4
出血	なし	0
	血便あり	1
	血便あり(全体)	2
	直腸から出血	4

[0096] また、DSSの飲水開始10日後に採取した大腸（結腸から直腸まで）の長さを、デジタルノギスを用いて測定した。

[0097] (2) 結果

試験期間中におけるマウスの体重変化を図3に示す（対照群について「saline」、ペプチド投与群について「1r10」参照）。対照群およびペプチド投与群ともにDSS飲水開始後経時的に体重が減少したが、その減少程度は対照群よ

リペプチド投与群の方が緩やかであり、DSS水溶液の飲水開始10日後にはペプチド投与群の体重は回復傾向を示した。

[0098] DSS水溶液の飲水開始8～10日後における便スコア（上記表3に記載の通りにスコア付けした「便の状態」スコアおよび「出血」のスコアの合計）およびDAIスコアをそれぞれ図4および5に示す（対照群について「saline」、ペプチド投与群について「1r10」参照）。便スコアおよびDAIスコアともに、対照群よりペプチド投与群の方が低い値を示した。

[0099] DSS水溶液の飲水開始10日後において、ペプチド投与群の大腸長は対照群より長かった（図6；対照群について「saline」、ペプチド投与群について「1r10」参照）。

[0100] IBDにおいては、腸管の粘膜に炎症が起こり、びらんや潰瘍が形成されるほか、腸管の狭小・短縮等の症状が生じ得る。また、IBDの他の症状として体重の減少が起こることが知られており、その原因は腸管の粘膜に生じる炎症や組織損傷（潰瘍等）による栄養状態の悪化にあると考えられている。また、動物のIBDモデルにおいて間葉系幹細胞を静注すると、体重減少ならびに腸管における上皮の損傷および炎症細胞の浸潤等を含む種々の症状が改善することが知られている。かかる症状の改善は、間葉系幹細胞の抗炎症作用によって腸管粘膜の炎症が抑制されること、およびその結果として粘膜組織の再生が促進されること等によるものである。

[0101] 本願の人工配列ペプチドをIBDモデルマウスに投与することにより、体重の減少が抑制され、大腸長の短縮が抑制され、DAIスコアが改善された。これは、本願の人工配列ペプチドの作用によって間葉系幹細胞が末梢血中に動員され、当該細胞により炎症抑制効果と組織再生効果が発揮された結果であると考えられる。

[0102] 参考例2

アトピー性皮膚炎に対する人工配列ペプチド1r10の有効性

[0103] (1) 材料および方法

i) 薬剤

マウスにアトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis ; 以下、「AD」とも称する) を誘導するため、MC903(一般名 : Calcipotriol)を用いた。また、参考例 1 に記載のペプチド1r10 (TFA塩) を被験物質として用いた。

[0104] i i) アトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

C57BL/6マウス (C57BL/6JJcl、7-8週齢、雄、微生物グレードSPF) を日本クレア株式会社より入手し、5日以上動物飼育室で馴化させた後、以下の実験に供した。当該マウスの耳介部皮膚に、エタノールで調整したMC903溶液を、2.25nmol MC903/耳/1回/1日の量で週に5回、2週間にわたって塗布 (合計10回塗布) し、アトピー性皮膚炎 (AD) を誘導した。かかるMC903誘導性のADモデルは、AD患者において実際に見られる上皮細胞からのTSLP分泌を人工的に誘導することにより一連の2型免疫反応カスケードを惹起させ、AD様病態を短期間(1-2週間)で再現させることができるモデルである (Li M et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 ;103 :11736-41.)。また、予備試験として正常マウスとMC903によるAD誘導マウス(誘導開始14日後)の耳介部の外観および組織を観察した結果、AD誘導マウスでは炎症による紅斑、辺縁領域における落屑、角質の苔癬化、表皮のAcanthosis (有棘細胞増殖による表皮肥厚)、局所的なバリアの破壊、真皮への免疫細胞の浸潤、真皮厚の増大、および表皮の一部におけるSpongiosis (海綿状変化) が生じることも確認できている。

[0105] i i i) ペプチドの投与

MC903の塗布開始 (Day 1とする) から2週後 (Day 15) に、落屑(Scaling)、紅斑(Erythema)、浮腫(Edema)の主症状から判断し、明らかにADが誘導された個体のみを選抜後、個体間の炎症の重症度の差異を考慮して、耳介厚に基づきグループ間で平均化処置を行い、対照群およびペプチド投与群 (各群n=7) に分けた。ペプチドの投与は、群分け日 (Day 15) に1回と、その後の4日 (Day 16からDay 19) の間に1回の合計2回、生理食塩水を用いて0.3mg/mLに調整したペプチド1r10の溶液を5mL/kgの容量 (ペプチドの投与量として1.5mg/kg) で尾静脈に注入することにより行った。対照群には、群分け日 (Day 15) に1回と、その後の4日 (Day 16からDay 19) の間に1回の合計2回、生理食

塩水を用いて0.3mg/mLに調整したウシ血清アルブミン（BSA）の溶液を5mL/kgの容量（BSAの投与量として1.5mg/kg）で尾静脈に注入した。

[0106] i v) ペプチドの投与による効果の評価

浮腫および落屑の評価

ペプチド投与期間中（Day 15からDay 19）は、浮腫（Edema）の判定のために耳介厚（Ear Swellings）の測定を毎日実施し、ADの主徴である落屑（Scaling）については耳介部から13-14cmの高さの固定台からデジタルカメラ（E-M1 II；Olympus社）を用いて写真撮影（週3回）により判定を行った。

[0107] 病理解析

ペプチドの投与開始後4日目（Day 19）にマウスをイソフルラン麻酔影響下に置き、頸椎脱臼を行って安楽死させ、氷上でサンプルのタンパク変性を防ぎつつ、すばやく耳介の炎症部位およびその周辺領域の皮膚を切り取り回収した。採取した耳介部皮膚は、ピンセットで余分な毛や皮膚を除去した後、10% Formalinに浸漬し、shakerを用いて氷上で振盪させながら、4℃で一晩固定させた。固定後の皮膚をリン酸緩衝食塩水（PBS）でよく洗浄し、トリミングした後、皮膚固有の背腹軸/左右軸の組織の極性に留意しながら自動包埋器（Excelsior ES；Thermo Scientific社）によりパラフィンプロックにした。その後、回転式ミクロトーム（HM 325；Thermo Scientific社）で薄切（5μm厚）してから、スライドガラス上に固定させ、各種染色に供した。病理学的解析として、組織化学染色および蛍光免疫染色法によりそれぞれ皮膚厚および免疫細胞の浸潤について評価を行った。

[0108] 真皮厚の測定

炎症部位の治癒状態を定量評価するため、上記の通り作成した皮膚組織のパラフィン薄切（5μm厚）に対してヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色を行い、真皮厚を測定した。その詳細は、1個体につき3枚の切片を用意し、各切片について炎症中心部位（center）、頭側（Head）および尾側（Tail）を1箇所ずつ顕微鏡（Keyence BZ-X710）で撮影した（即ち、1個体につき計9箇所撮影）。次に撮影した画像について表皮真皮接合部（Epidermis-Dermis junction）

から皮下脂肪－軟骨接合部 (Subcutaneous Fat-Cartilage junction) までの垂線を引いて視野中の最長の垂線のみを選抜し真皮厚の測定値として用いた。

[0109] 免疫細胞の定量

炎症部位の免疫細胞数を定量評価するため、上記の通り作成したパラフィン薄切(5 μ m厚)に対して抗Laminin抗体および抗CD45抗体を用いて蛍光免疫染色を行った (Lamininの検出には、1次抗体としてAnti-Laminin (Sigma Aldrich社; カタログ番号 L9393)、2次抗体としてDonkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific社; カタログ番号A-21206)を使用した。CD45の検出には、1次抗体としてGoat Anti-mouse CD45 (R&D Systems社; カタログ番号 AF114)、2次抗体として Cy3 AffiniPure Bovine Anti-Goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch社; カタログ番号 805-165-180)を使用した)。定量の詳細としては、1個体につき3枚の切片を用意し、各切片における炎症中心部位(center)、頭側(Head)および尾側(Tail)について1箇所ずつ、顕微鏡 (Keyence BZ-X710) で高倍率視野 (HPF: 400x) を撮影した (即ち、1個体につき計9箇所撮影)。次に撮影した画像について視野中のCD45陽性細胞 (Cy3の蛍光で検出) をカウントし、測定値として用いた。

[0110] 統計処理

上記解析によって得られた測定値または補正後の算出値は、統計解析ソフト (statcel-3(OMS出版)およびExcel統計(BellCurve))を用いて各統計値を計算後、解析/判定を行った。具体的には、事前検定として(1)正規性の検定(歪度/尖度係数でのダゴスティーノ検定; $P>0.05$ を正規分布とみなす。)(2)棄却検定 (Grubbs検定; $P<0.05$ の場合、外れ値 (outlier) とみなす)を行い、(1)で得られた結果が正規分布を示す場合には群間でt-testを行った。正規分布を示さない場合には群間の順位によるノンパラメトリック検定としてMann whitney U-testを行い、 $p<0.05$ の場合に有意差ありと判定した。また時系列における反復測定を主とする体重変化および耳介厚変化については、Repeated one way ANOVA testを実施し、さらにpost hoc testとしてTukey-Kramer t

estを行った。外れ値の処理に関しては、(a)Grubbs検定で $P < 0.05$ となった群内の個体数が当該群の全個体数（ n 数）に対して10%以下の場合は当該外れ値を欠損値として取り扱い、(b) $P < 0.05$ となった個体数が n 数に対して10%を超える場合は外れ値を有さない他の個体での平均値を補完的に代入（imputation）する方法を採用した（所謂Mean substitution）。

[0111] （2）結果

落屑

ADモデル誘導後の対照群マウスの耳介部では、典型的なAD像である湿疹と乾燥に起因する剥離表皮による落屑が辺縁部に高頻度に生じた（図7、左写真の矢印部分）。一方、ペプチド投与群では、耳介部における落屑の軽減が認められた（図7、右写真の矢印部分）。

[0112] 耳介厚（浮腫）

ペプチド投与期間中の耳介厚（浮腫）の推移を図8に示す（対照群について「Control」、ペプチド投与群について「1r10」参照）。ペプチド投与群では、対照群と比較して統計的に有意な耳介厚の減少が認められた。

[0113] 真皮厚

皮膚組織切片に対してH.E.染色を行った結果、対照群においては、AD非誘導マウスでは見られない真皮厚の増大（ADで引き起こされる免疫反応に伴う細胞浸潤と血管透過性の亢進に起因するものと考えられる）が観察された（図9；対照群について「Control」、ペプチド投与群について「1r10」参照）。一方、ペプチド投与群では、対照群と比較して統計的に有意な真皮厚の減少が認められた（図10；対照群について「Control」、ペプチド投与群について「1r10」参照）。また、0.5mg/kgの用量でペプチド1r10を投与した場合にも、対照群と比較して統計的に有意な真皮厚の減少が見られた（データ示さず）。

[0114] 免疫細胞の浸潤

皮膚組織切片に対して蛍光免疫染色を行った結果、対照群では、ADで引き起こされる免疫反応に伴うCD45陽性免疫細胞の組織内浸潤が血管周囲（Lamin

inで標識される)を始めとする皮膚全体に見られた(図11の矢印部分;対照群について「Control」、ペプチド投与群について「1r10」参照)。一方、ペプチド投与群では、対照群と比較して統計的に有意なCD45陽性細胞数の減少が認められた(図12;対照群について「Control」、ペプチド投与群について「1r10」参照)。

[0115] なお、本試験の実施期間中(投与開始(Day 15)～皮膚回収時(Day 19))におけるマウスの体重変化は、いずれの群においても目立った差はなく、群間において統計的に有意な変化も認められなかった($p>0.05$, Repeated one-way ANOVA)。

[0116] 本参考例では、本願の人工配列ペプチドをアトピー性皮膚炎モデルマウスに投与することにより、落屑および浮腫が抑制され、真皮厚の増大が抑制され、且つ、CD45陽性細胞の浸潤が抑制された。これは、本願の人工配列ペプチドの作用によって間葉系幹細胞が末梢血中に動員され、当該細胞により炎症抑制効果が発揮された結果であると考えられる。

[0117] 参考例3

脳梗塞に対する人工配列ペプチド1r10の有効性

[0118] (1) 材料および方法

i) 薬剤

参考例1に記載のペプチド1r10(TFA塩)を被験物質として用いた。

[0119] ii) 脳梗塞モデルラットの作成

CrI:CD(SD)ラット(7週齢、雄)を日本チャールス・リバーより入手し、6日間の馴化の後、対照群($n=8$)とペプチド投与群($n=8$)に分けた。群分けの翌日に、ラットを2%イソフルラン吸入麻酔下(麻酔背景は笑気:酸素 = 7:3)にて仰臥位に固定した。手術中の体温調節を行うためにデジタル温度計に接続した体温計用プローブを直腸内に挿入し、手術前後の直腸温の変化をモニターした。その結果、いずれのラットも直腸温の低下は認められなかったため、加温は実施しなかった。右総頸動脈、右外頸動脈および右内頸動脈を露出し、右総頸動脈および右外頸動脈を縫合糸で結紮した。予めシリコ

ンでコーティングし、19 mmの長さに切断した4号のナイロン糸（栓子）を右外頸動脈と右内頸動脈の分岐部より挿入し、右中大脳動脈（MCA）を閉塞した。右MCA閉塞後、頸部皮膚の縫合を行い、麻酔から解放した。右MCA閉塞後30分に閉塞側の対側前肢の屈曲を確認した。2%イソフルランの吸入麻酔下にて、再び右総頸動脈、右外頸動脈および右内頸動脈を露出し、右MCA閉塞後90分に栓子を抜き、右MCAの血流を再開させた。右MCAの血流再開後に右内頸動脈の結紮および頸部皮膚の縫合を行い、麻酔から解放した。なお、右MCA閉塞手術前にベンジルペニシリンカリウムを20000 units/kgの用量で筋肉内投与した。

[0120] i i i) ペプチドの投与

ペプチドの投与は、右MCA閉塞後105分および24時間の時点において、生理食塩水を溶媒として1mg/mLの濃度に調整したペプチド1r10の溶液を2mL/kgの容量（ペプチドの投与量として 2mg/kg）で尾静脈に注入することにより行った。対照群には、右MCA閉塞後105分および24時間の時点において、生理食塩水を2mL/kgの容量で尾静脈に注入した。

[0121] i v) ペプチドの投与による効果の評価

脳梗塞巣体積率の算出

右MCA閉塞後48時間でペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg、腹腔内投与）による麻酔下で動物を断頭し、全脳を摘出して厚さ2 mmの脳切片を作製した。脳切片はPaxinos and Watson脳図譜（Paxinos G. and Watson C., The rat brain in stereotaxic coordinates, second edition, Academic Press Inc.; 1986）を参考に、Bregma前方4 mm、Bregma前方2 mm、Bregma上、Bregma後方2 mm、Bregma後方4 mmおよびBregma後方6 mmの冠状面が得られる位置とした。脳切片は、1 w/v% の2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液に室温で浸漬・染色して写真撮影を行った。得られた写真を画像解析し、脳梗塞巣面積および脳の断面積を実測値で求め、下記計算式によりBregma前方4 mm～Bregma後方6 mmの脳梗塞巣体積および脳の総体積を算出した。また、脳梗塞巣体積および脳の総体積より脳梗塞巣体積率を算出した（脳梗塞

巣体積率 (%) = 脳梗塞巣体積 / 脳の総体積 × 100)。

$$V = 2(a + b + \sqrt{ab})/3 + 2(b + c + \sqrt{bc})/3 + 2(c + d + \sqrt{cd})/3 + 2(d + e + \sqrt{de})/3 + 2(e + f + \sqrt{ef})/3 \\ = 2(a + f + \sqrt{ab} + \sqrt{bc} + \sqrt{cd} + \sqrt{de} + \sqrt{ef})/3 + 4(b + c + d + e)/3$$

V : 脳梗塞巣体積または脳の総体積 (mm³)

a : Bregma前方4 mm断面上の脳梗塞巣面積または脳の断面積 (mm²)

b : Bregma前方2 mm断面上の脳梗塞巣面積または脳の断面積 (mm²)

c : Bregma断面上の脳梗塞巣面積または脳の断面積 (mm²)

d : Bregma後方2 mm断面上の脳梗塞巣面積または脳の断面積 (mm²)

e : Bregma後方4 mm断面上の脳梗塞巣面積または脳の断面積 (mm²)

f : Bregma後方6 mm断面上の脳梗塞巣面積または脳の断面積 (mm²)

[0122] (2) 結果

対照群およびペプチド投与群の脳梗塞巣体積率は、それぞれ34.1±1.1%および27.2±1.2% (平均値±標準誤差) であった (図13 ; 対照群について「Control」、ペプチド投与群について「1r10」参照)。対照群と比較してペプチド投与群の脳梗塞巣体積率は低い値を示し、統計学的に有意差が認められた (Mann-WhitneyのU検定、p<0.01)。

[0123] 本参考例では、本願の人工配列ペプチドを脳梗塞モデルラットに投与することにより、脳梗塞巣を縮小させる効果が得られた。これは、本願の人工配列ペプチドの作用によって間葉系幹細胞が末梢血中に動員され、当該細胞により炎症抑制効果、trophic効果 (栄養因子の分泌)、組織再生効果等が発揮された結果であると考えられる。

産業上の利用可能性

[0124] 本願のペプチドは、間葉系幹細胞を末梢血中に動員するための組成物、ならびに炎症性疾患、自己免疫疾患、線維性疾患、および組織の損傷／虚血／壊死を伴う疾患の治療薬として用いることができる。