

明 細 書

発明の名称：

骨髄間葉系および/または多能性幹細胞の血中動員による組織再生促進剤 技術分野

[0001] 本発明は、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される組織再生促進剤に関する。

背景技術

[0002] 再生医療は、損傷臓器の機能的、器質的再生を目的とした医療であり、体外で培養し加工した細胞もしくは組織を利用している。例えば、皮膚培養シートなどは本人もしくは他人から採取した皮膚細胞を体外で培養し、シート状に加工した製品を、損傷皮膚に移植する。再生医療では、治療に使用する細胞を確保するために、細胞を体外で培養増殖させる必要がある。培養操作によって、細胞の劣化(老化、腫瘍化、細菌・ウイルス等のコンタミネーション)の可能性が生じるため、安全性維持のためにGMP基準を保証された施設における製造が必須であり、治療費の高額化が課題となる事が予想される。

一方、生体は臓器の損傷時の為に、損傷部位の修復再生機構を備えているが、損傷部位が大きい場合には非機能的な瘢痕組織によって損傷部位を塞ぐことが知られている。このような瘢痕組織による損傷治癒は、脳梗塞や脊髄損傷では、神経再生の阻害因子となり、心筋梗塞では心破裂の要因となり、広範囲熱傷や手術創ではケロイドとなるなど、生命予後、美容面においてQOLを著しく損なう原因となっている。生体が持つ損傷組織の修復再生機構を賦活化することが可能になれば、瘢痕治癒することなく機能的な組織による損傷組織(臓器)の再生を誘導することが期待できる。

骨髄内には、白血球や赤血球などに分化する造血系幹細胞の他、骨、軟骨、脂肪などに分化可能な間葉系の幹細胞が存在することが知られているが、近年になって上皮系や神経系の細胞に分化することが可能な多能性幹細胞が存在することが明らかになってきている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：WO 2008/053892

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 従来の治療法では治療困難な、広範囲皮膚潰瘍、難治性骨折、脳梗塞などの難治性疾患に対して、生理的な修復再生機構の活性化によって損傷組織の治療を誘導する新規治療方法の開発を課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] マウスを用いて、皮膚潰瘍部位治療過程における、HMG-1及びS100A8による骨髄由来細胞の皮膚潰瘍部への動員効果を確認したところ、皮膚潰瘍部に対して遠位かつ異所である静脈血内にHMG-1又はS100A8を投与することによって皮膚潰瘍部位に骨髄由来細胞が動員されることが明らかにした。次に、HMG-1及びS100A8の静脈内投与による皮膚潰瘍治療促進効果を確認したところ、潰瘍部位から遠位かつ異所である血管内にそれらを投与することで皮膚潰瘍の治療を促進することに成功した。さらに、皮膚潰瘍の非癒痕性治療促進効果を確認したところ、HMG-1を静脈内投与することによって血液中に動員された骨髄由来細胞の潰瘍部分へのさらなる動員が促進され、皮膚潰瘍の早期閉鎖と非癒痕性治療を促進することが可能であることが判明した。

また、脳梗塞モデルマウス脳における骨髄由来細胞の存在を確認したところ、脳梗塞作製後HMG-1を静脈投与したマウスにおいて、神経細胞マーカーを発現する骨髄由来細胞を脳内に認めた。次に、脳梗塞巣の縮小効果を確認したところ、コントロールマウスと比較して、HMG-1静脈投与マウスにおいて、脳梗塞巣において顕著な改善効果が確認された。また、脳梗塞後の生存率改善を確認したところ、HMG-1静脈投与例ではマウスの生存率が上昇した。さらに、マウスを用いて、骨折治療過程における、骨折部以外の部位の骨

髄多能性幹細胞の関与を確認したところ、損傷部位遠方の骨髄由来細胞が骨折部分に移動して損傷組織の修復を行っていることが明らかになった。

さらに、骨折モデルマウスを用いて、HMGB1静脈投与による損傷部位への骨髄間葉系幹細胞の動員活性を評価したところ、HMGB1の静脈内投与によって血中内に動員された骨髄間葉系幹細胞が骨折部分に集まってくることが明らかになった。

[0006] 本願は、この知見に基づき、以下の発明を提供するものである。

〔１〕以下の（a）から（q）のいずれかに記載の物質を含有する組織再生促進剤であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される薬剤；

- （a）HMGB1タンパク質
- （b）HMGB1タンパク質を分泌する細胞
- （c）HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （d）HMGB2タンパク質
- （e）HMGB2タンパク質を分泌する細胞
- （f）HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （g）HMGB3タンパク質
- （h）HMGB3タンパク質を分泌する細胞
- （i）HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （j）S100A8タンパク質
- （k）S100A8タンパク質を分泌する細胞
- （l）S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （m）S100A9タンパク質
- （n）S100A9タンパク質を分泌する細胞
- （o）S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （p）細胞又は組織の抽出液
- （q）細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

〔２〕非経口投与される、〔１〕記載の薬剤。

〔３〕注射投与である、〔２〕記載の薬剤。

〔４〕血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与される、〔１〕記載の薬剤。

〔５〕細胞又は組織の抽出液が細胞又は組織を溶媒に浸す工程を含む方法で製造される、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の薬剤。

〔６〕細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分が以下の工程を含む方法で製造される、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の薬剤；

（ａ）細胞又は組織を溶媒に浸す工程、

（ｂ）工程（ａ）で得られる抽出液を固定化ヘパリンに接触させる工程、および

（ｃ）固定化ヘパリンからヘパリン結合画分を溶出する工程。

〔７〕神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生促進に用いられる、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の薬剤。

〔８〕以下の（ａ）から（ｑ）のいずれかに記載の物質を含有する組成物を含む、組織再生促進キットであって、該組成物が、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される前記キット；

（ａ）HMGB1タンパク質

（ｂ）HMGB1タンパク質を分泌する細胞

（ｃ）HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ｄ）HMGB2タンパク質

（ｅ）HMGB2タンパク質を分泌する細胞

（ｆ）HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ｇ）HMGB3タンパク質

（ｈ）HMGB3タンパク質を分泌する細胞

（ｉ）HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ｊ）S100A8タンパク質

（ｋ）S100A8タンパク質を分泌する細胞

（ｌ）S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ｍ）S100A9タンパク質

- (n) S100A9タンパク質を分泌する細胞
- (o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (p) 細胞又は組織の抽出液
- (q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

〔 9 〕 非経口投与される、〔 8 〕 記載のキット。

〔 1 0 〕 注射投与である、〔 9 〕 記載のキット。

〔 1 1 〕 血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与される、〔 8 〕 記載のキット。

〔 1 2 〕 神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生促進に用いられる、〔 8 〕 ～ 〔 1 1 〕 のいずれかに記載のキット。

〔 1 3 〕 以下の (a) から (q) のいずれかに記載の物質を含有する組成物を、再生が必要な組織とは異なる組織にその有効量を投与する工程を含む、組織の再生を促進する方法；

- (a) HMGB1タンパク質
- (b) HMGB1タンパク質を分泌する細胞
- (c) HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (d) HMGB2タンパク質
- (e) HMGB2タンパク質を分泌する細胞
- (f) HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (g) HMGB3タンパク質
- (h) HMGB3タンパク質を分泌する細胞
- (i) HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (j) S100A8タンパク質
- (k) S100A8タンパク質を分泌する細胞
- (l) S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (m) S100A9タンパク質
- (n) S100A9タンパク質を分泌する細胞
- (o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(p) 細胞又は組織の抽出液

(q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

〔14〕非経口投与である、〔13〕記載の方法。

〔15〕注射投与である、〔14〕記載の方法。

〔16〕血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与する、〔13〕記載の方法。

〔17〕神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生を促進する、〔13〕～〔16〕のいずれかに記載の方法。

〔18〕組織再生促進剤の製造における以下の(a)から(q)のいずれかに記載の物質を含有する組成物の使用であって、該組織再生促進剤が、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される、前記使用；

(a) HMGB1タンパク質

(b) HMGB1タンパク質を分泌する細胞

(c) HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(d) HMGB2タンパク質

(e) HMGB2タンパク質を分泌する細胞

(f) HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(g) HMGB3タンパク質

(h) HMGB3タンパク質を分泌する細胞

(i) HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(j) S100A8タンパク質

(k) S100A8タンパク質を分泌する細胞

(l) S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(m) S100A9タンパク質

(n) S100A9タンパク質を分泌する細胞

(o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(p) 細胞又は組織の抽出液

(q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

〔 1 9 〕 該組織再生促進剤が非経口投与される、〔 1 8 〕 記載の使用。

〔 2 0 〕 注射投与である、〔 1 9 〕 記載の使用。

〔 2 1 〕 該組織再生促進剤が血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与される、〔 1 8 〕 記載の使用。

〔 2 2 〕 該組織再生促進剤が、神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生促進剤である、〔 1 8 〕 ～〔 2 1 〕 のいずれかに記載の使用。

〔 2 3 〕 組織の再生を促進する方法に使用するための、以下の（ a ） から（ q ） のいずれかに記載の物質を含有する組成物であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される、前記組成物；

（ a ） HMGB1タンパク質

（ b ） HMGB1タンパク質を分泌する細胞

（ c ） HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ d ） HMGB2タンパク質

（ e ） HMGB2タンパク質を分泌する細胞

（ f ） HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ g ） HMGB3タンパク質

（ h ） HMGB3タンパク質を分泌する細胞

（ i ） HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ j ） S100A8タンパク質

（ k ） S100A8タンパク質を分泌する細胞

（ l ） S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ m ） S100A9タンパク質

（ n ） S100A9タンパク質を分泌する細胞

（ o ） S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

（ p ） 細胞又は組織の抽出液

（ q ） 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

〔 2 4 〕 非経口投与される、〔 2 3 〕 記載の組成物。

〔 2 5 〕 注射投与である、〔 2 4 〕 記載の組成物。

〔２６〕血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与される、〔２３〕記載の組成物。

〔２７〕組織の再生を促進する方法が、神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生を促進する方法である、〔２３〕～〔２６〕のいずれかに記載の組成物。

発明の効果

[0007] 損傷組織再生医薬としては、HGF、EGF、VEGF、FGFなどの細胞増殖因子が知られているが、これらは損傷部位およびその近傍組織に直接投与し細胞の増殖を促進することを期待して使用されている。

HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、S100A9は骨髄多能性幹細胞を動員する活性を有している。骨髄多能性幹細胞は間葉系の他、上皮系や神経系の細胞にも分化可能である。広範囲の組織損傷の際に、骨髄多能性幹細胞を血流を介し損傷部位に動員する事が可能になれば、骨髄多能性幹細胞による生理的な損傷組織の修復再生を促進することが期待できる。

本発明により、骨髄多能性幹細胞動員因子である、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、S100A9を静脈内投与などの方法で損傷部位から遠位部に投与することで、末梢血中に骨髄多能性幹細胞を動員し、損傷組織修復を促進する方法が提供された。例えば脳梗塞の様な体内深部臓器の疾患を治療する場合、損傷部位（脳）への治療薬の直接投与は困難である。一方、本発明では、一般診療において広く施行されている静脈投与による治療を可能にしたため、治療薬を任意の回数、濃度で安全かつ簡便に投与することが可能となり、このことは従来の治療方法と比較して優れた効果である。

また、最近開発された骨髄細胞を使用した脳梗塞の治療法としては、患者本人の骨髄から細胞を採取し血液循環中に再投与する方法が有効であることが知られているが、骨髄細胞採取の際には体内深部の骨髄に太い針を刺して吸引する必要があるため大きな侵襲を伴うことが避けられない。これに対し、本発明では、薬剤を静脈内投与することで骨髄細胞を直接血液循環中に動員する事が可能であるため、脳梗塞の患者に頻回に投与しても大きな侵襲を

伴うことがない。

骨髄由来の多能性幹細胞は間葉系、上皮系、神経系などの多様な細胞に分化する潜在能力を有するが、損傷部位に移動した後は周囲のニッチ環境に応じて分化し組織修復を誘導すると考えられる。再生医療や細胞治療では希少な骨髄多能性幹細胞を生体外で培養し増殖させた後に治療に利用するが、従来の医薬品と異なり、培養過程で起きうる細胞の劣化（癌化や細菌、ウイルスなどのコンタミネーション）の危険があるため十分な安全管理が必要である。本発明では、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、S100A9を投与することで、骨髄多能性幹細胞を末梢循環血内に動員するが、細胞を体外に取り出し人工的操作を加えることはしないため安全性の高い治療法である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] HMGB1の精製過程を示す写真である。HMGB1のN末端側にGST-tag 6XHis-tag HRV3Cによる切断配列を含有する発現ベクターをHEK293にトランスフェクションした。培養上清をニッケルカラムに結合させ、結合画分をイミダゾールで溶出した。さらに、ニッケルカラム結合画分をHRV3CによってGST-tag 6XHis tagをHMGB1から切断したあと、ヘパリンアフィニティーカラムに結合させ、塩化ナトリウムによる溶出を行った。ヘパリン結合画分をQカラムに結合させ、塩化ナトリウムによる溶出を行った。それぞれの精製過程における精製度を検出するために、カラムに結合した分画をSDS-PAGEしたあとクマシー染色をおこなった。

[図2] 潰瘍が閉鎖した後の皮膚および皮膚の薄切切片のGFPのシグナルを示す写真である。GFP骨髄移植マウスの背中に皮膚潰瘍を作製し、HMGB1もしくはS100A8を経静脈投与した。HMGB1およびS100A8を経静脈投与したマウスの皮膚には、コントロールに比較し、GFP陽性である骨髄由来細胞が多数検出された。

[図3] 経時的に測定した皮膚潰瘍面積を示すグラフである。マウスの背中に皮膚潰瘍を作製し、HMGB1もしくはS100A8を経静脈投与した。潰瘍作製後3日目には、コントロール群に比較しHMGB1投与群で皮膚潰瘍の縮小効果が認められ

た。潰瘍作製後7日目には、コントロール群に比較しS100A8投与群で皮膚潰瘍の縮小効果が認められた（縦軸；潰瘍面積÷皮膚潰瘍作製時の面積X100, 横軸；皮膚潰瘍作製後の日数）。

[図4] 皮膚潰瘍閉鎖後、皮膚の薄切切片をヘマトキシリン・エオシン染色（HE）、マッソン・トリクローム染色（MT）した結果を示す写真である。マウスの背中に皮膚潰瘍を作製し、HMGB1を経静脈投与した。コントロールマウスでは膠原線維が異常な増加が認められるのに対し、HMGB1を経静脈投与したマウスでは膠原線維の異常な増加が抑制されている。

[図5] Nestin（神経幹細胞マーカー）および β III tubulin（ニューロンマーカー）発現細胞の検出結果を示す写真である。GFP骨髓移植マウスに脳梗塞を作製しHMGB1を経静脈投与し治療を行った。治療終了後、脳の薄切切片を作製して免疫組織化学を行った。左の写真における矢印の細胞はGFP陽性かつNestin陽性の細胞である。また右の写真における矢印の細胞はGFP陽性かつ β III tubulin陽性の細胞である。骨髓由来の細胞が神経のマーカーを発現していることが確認された。

[図6] 梗塞部位の検出結果を示す写真である。脳梗塞疾患モデルマウスを作製し、HMGB1を経静脈投与した。治療終了後、脳の薄切切片を作製しニッスル染色を行った。PBS投与例（コントロール）では皮質に壊死した組織を認めるが、HMGB1治療例では皮質に壊死した組織を認めなかった。

[図7] 脳梗塞作製後7日間の生存率を示すグラフである。脳梗塞疾患モデルマウス（45分間虚血、60分間虚血）を作製した後、HMGB1を経静脈投与による治療を行った。45分間の虚血、60分間の虚血いずれにおいてもHMGB1による治療によって生存率の改善を確認した。

[図8] 皮膚で結合されたGFP骨髓移植マウスと野生型マウスにおいて、GFP骨髓キメラマウスの骨髓細胞が野生型マウスの右足の骨折部位に移動し、骨芽細胞に分化したことを示す写真である。GFP骨髓移植マウスと野生型マウスとを皮膚で結合し、野生型マウスに骨折を作製した。骨折部位の治癒後、オステオカルシンを発現している骨芽細胞の中にGFP陽性細胞が存在した。骨折の治

癒過程においては、損傷部位から遠方の骨髓由来細胞が骨折部位に移動し骨芽細胞に分化することによって生理的損傷治癒を行っていることを示唆している。

[図9] GFP骨髓移植マウス背部への皮膚移植後に観察した移植皮膚片に対するGFP蛍光集積を示す写真である。上段左の写真は皮膚移植部の肉眼像を、上段中央の写真は移植皮膚とレシピエント皮膚の境界部（「↓」で示した部分）近傍でレシピエント皮膚のHE組織像を、上段右の写真は植皮皮膚のHE組織像を示す。また下段左の写真は植皮皮膚へのGFP蛍光の集積を、下段中央の写真は植皮部の拡大像を、下段右の写真は同拡大部皮膚へのGFP蛍光の集積を示す。

[図10] GFP骨髓移植マウス背部への移植皮膚片に集積した骨髓由来表皮細胞、骨髓由来真皮線維芽細胞を示す写真である。左から1列目はDAPI染色（核染色）で、上段の写真は植皮部皮膚の弱拡大像（100倍）を、中段の写真はその強拡大像（200倍）で表皮・真皮境界部を、下段は強拡大像（200倍）で毛包部を示す。左から2列目は1列目のそれぞれの領域のGFP蛍光像、左から3列目はそのケラチン5（K5）の免疫染色像を、左から4列目はそれぞれの蛍光を重ね合わせた像（Merge）を示す。GFP陽性表皮細胞および真皮線維芽細胞が多数観察されている。

[図11] ボイデン・チャンバーを用いた皮膚抽出液の骨髓由来間葉系幹細胞遊走能活性測定結果を示す写真である。上段左の写真はボイデン・チャンバーの上槽内からシリコン膜上の微細穴を通過して皮膚抽出液側（下槽側）に遊走し、シリコン膜下槽側に付着している骨髓間葉系幹細胞を、青色色素にて染色した像で、上から培養開始直後（0h）、12時間後（12h）、24時間後（24h）の染色像（各4ウェルずつ）を示す。上段右の写真は0hの強拡大像、下段左の写真は12hの強拡大像、下段右の写真は24hの強拡大像を示す。

[図12] 皮膚抽出液精製分画標品群におけるボイデン・チャンバーを用いた骨髓由来間葉系幹細胞遊走能活性測定結果と、それぞれの精製分画標品のSDS-PAGE電気泳動の結果との対応を示す写真である。左から第1レーン（M.W.）は

分子量マーカーを泳動、第2レーン (G. E.) は精製前皮膚抽出液を泳動、第3レーン (H. A.) はヘパリンアフィニティーカラム結合分画 (中間精製分画) を泳動、第4~13レーン (A. E.) は種々のNaCl濃度で溶出した陰イオン交換カラム結合分画 (最終精製分画) を泳動した後の銀染色像を示す。さらに、骨髓由来間葉系幹細胞遊走活性の最も強い最終精製分画番号4の泳動ゲル銀染色像 (レーン7) における各染色バンドを切り出して質量分析およびデータベース解析を行った結果、「←」で示したバンドがHMGB1であることが明らかとなった。

[図13] ボイデン・チャンバーを用いたHMGB1の骨髓由来間葉系幹細胞遊走活性測定結果を示す写真である。上段の二つは皮膚抽出液中へ遊走した骨髓由来間葉系幹細胞の染色像を、中段の二つはHMGB1精製標品へ遊走した骨髓由来間葉系幹細胞の染色像を、下段は中段に用いたHMGB1精製標品に抗HMGB1ポリクロナール抗体を加えて中和した溶液へ遊走した骨髓由来間葉系幹細胞の染色像 (殆ど遊走活性は消失) を示す。

[図14] HMGB1による生体内骨髓由来間葉系幹細胞動員活性を示す写真である。HMGB1分画 (最終精製分画番号4) は、対照コントロール (最終精製分画番号1) の約3倍の動員活性を示した。

[図15] HMGB1分画 (最終精製分画番号4) により生体内で動員された細胞の強拡大の写真である。

[図16] シリコンチューブ内遊走細胞の培養開始直後の写真である。左の写真は培地内に播種した遊走細胞の明視野像を、右の写真はその暗視野におけるGFP蛍光像を示す。

[図17] シリコンチューブ内遊走細胞の培養開始24時間後の写真である。左の写真は培養プラスチックシャーレに付着して増殖している線維芽細胞様細胞および上皮細胞様細胞の明視野像を、右の写真はその暗視野におけるGFP蛍光像を示す。

[図18] シリコンチューブ内遊走細胞の培養開始2週間後の写真である。左右の写真は同一の視野で、左の写真は明視野、右の写真は蛍光フィルター (Bお

よびDはGFPの蛍光を検出する、Fはケラチン5の蛍光を検出する)を通した写真である。培養プラスチックシャーレに円形にコロニーを形成する骨髄由来GFP陽性細胞集団の左側に、線状の毛髪状の形態を認める<△(矢印)で示す>。Fは骨髄由来細胞が毛髪状の形態変化を呈しさらにケラチン5を発現していることを示している(△(矢印)で示す)。

[図19]新生マウス皮膚抽出液中のHMGBファミリーをWestern blot法を用いて検出した写真である。

[図20]哺乳類細胞におけるHMGBファミリーの発現ベクターのMAPを示す図である。cytomegalovirus enhancerとchicken β -actin promoterを持ち、プロモーター下流に存在するHMGBファミリーのcDNA(complementary DNA:相補DNA)がコードするmRNAを大量に合成する。

[図21]HEK293細胞に発現させた精製リコンビナントFlag tag-HMGBファミリー融合タンパクのWestern blotの結果を示す写真である。

[図22]ボイデン・チャンバーを用いたリコンビナントHMGB1・HMGB2・HMGB3の骨髄間葉系幹細胞遊走活性を示す図である。いずれのリコンビナントタンパクもコントロール群に比べ遊走活性を示した。

[図23]マウスの皮膚潰瘍治療モデルにおけるHMGBファミリーによる治療結果を示す図である。HMGB1・HMGB2・HMGB3いずれもコントロール群に比べ有意に潰瘍面積の縮小効果を示した。

[図24]ヒトHMGB1及びヒト皮膚抽出液がヒト骨髄由来間葉系幹細胞を遊走する活性をボイデン・チャンバーを用いて確認した写真である。

[図25]マウス心臓、マウス脳及びマウス皮膚抽出液中の骨髄間葉系幹細胞誘導活性物質をヘパリンカラムで精製し、ボイデン・チャンバーを用いて、活性を確認した写真である。

[図26]培養細胞株HEK293およびHeLa抽出液のヒト骨髄間葉系幹細胞遊走活性をボイデン・チャンバー法を用いて確認した写真である。いずれの培養細胞株もヒト骨髄間葉系幹細胞遊走活性を示した。

[図27]Aはマウスを脳定位固定装置に固定し、メスにて頭部に正中切開しドリ

ルを用いて穿頭を施した写真である。Bは脳にシリンジを用いて、陰圧をかけ、脳組織を一部吸引した写真である。Cはフィブリン糊製剤のフィブリノゲンに溶解した皮膚抽出液へパリンカラム精製画分を5 μ l注入し、次にフィブリン糊製剤のトロンビンを5 μ l注入した後の写真である。DおよびEは脳損傷モデル治療後2週間後の写真である。コントロールのDに比べ皮膚抽出液へパリンカラム精製画分による治療群のEでGFP陽性細胞の集積が認められた。FおよびGは脳損傷モデル治療後6週間後の写真である。コントロールのFに比べ皮膚抽出液へパリンカラム精製画分による治療群のGでGFP陽性細胞の集積が認められた。

[図28] マウス尾静脈から、皮膚抽出液 (SE) を投与し、末梢血を採取する図である。

[図29] マウス尾静脈から、HMGB1を投与し、末梢血を採取する図である。

[図30] 皮膚抽出液 (SE) を投与後 1 2 時間後のマウス末梢血単核球画分を抗マウスPDGFR α 抗体、抗マウスCD44抗体で蛍光標識し、フローサイトメトリーで分画した図である。上段 3 つは陰性コントロールのPBS投与群 (n=3)、下段 3 つは皮膚抽出液 (SE) 投与群 (n=3) である。縦軸はCD44の発現量を横軸はPDGFR α の発現量を示している。青線で囲んだ部分がCD44陽性かつPDGFR α 陽性細胞群を示し、皮膚抽出液投与群 (SE) でPBS群に比して増加している。

[図31] HMGB1を投与後 1 2 時間のマウス末梢血単核球画分を抗マウスPDGFR α 抗体、抗マウスCD44抗体で蛍光標識し、フローサイトメトリーで分画した図である。左は陰性コントロールのPBS投与マウス、右はHMGB1投与マウスの図である。縦軸はCD44の発現量を横軸はPDGFR α の発現量を示している。青線で囲んだ部分がCD44陽性かつPDGFR α 陽性細胞群を示し、HMGB1投与マウスでPBS投与マウスに比して増加している。

[図32] AはCD44およびPDGFR α をもつ細胞の存在頻度を表したフローサイトメトリーの結果を示す図である。末梢血中のPDGFR α 陽性かつCD44陽性細胞およびPDGFR α 陽性かつCD44陰性細胞いずれの細胞群もHMGB1投与によって増加している。BはPDGFR α 陽性かつCD44陽性細胞、CはPDGFR α 陽性かつCD44陰性細胞

胞についてそれぞれPBS投与群とHMGB1投与群で末梢血中の出現頻度を比較した結果を示す図である。いずれの細胞群においても、HMGB1投与群において統計的に有意に増加している。

[図33] GFP骨髓移植マウス背部への皮膚移植後に観察した移植皮膚片に対するGFP蛍光集積を示す写真である。左写真 (A) はDAPIで核を染色している。中央の写真 (B) は植皮部に集積したGFP陽性骨髓由来細胞を緑色蛍光色で示している。右写真 (C) は、写真 (A) と写真 (B) を重ね合わせた図である。骨髓由来細胞が皮膚組織を再構築している。

[図34] ボイデン・チャンバーを用いた皮膚抽出液の骨髓由来間葉系幹細胞遊走能活性測定結果を示す写真である。ボイデン・チャンバーの上槽内から8 μ mの微細穴を持つポリカーボネートメンブレン膜の微細穴を通過して皮膚抽出液を含む下槽側に遊走し、膜下槽側に付着している骨髓間葉系幹細胞を、青色色素にて染色した像である。下層には2日齢マウスおよび6週齢マウスから採取した皮膚の抽出液を入れた。

[図35] 皮膚抽出液中のS100A8、S100A9のタンパク質の存在をWestern blot 法で確認した写真である。

[図36] 皮膚抽出液中のHeparin 結合タンパク質をHeparin affinity column からNaCl濃度勾配によって溶出した結果を示す写真である。それぞれのフラクションのタンパク質をSDS-PAGEによって分画し銀染色にて検出した。

[図37] ボイデン・チャンバーを用いた皮膚抽出液の骨髓由来間葉系幹細胞遊走能活性測定結果を示す写真である。ボイデン・チャンバーの上槽内から膜上の微細穴を通過して皮膚抽出液のヘパリン結合した各分画（下槽側）に遊走し、膜下槽側に付着している骨髓間葉系幹細胞を、青色色素にて染色した像である。

[図38] 皮膚抽出液のヘパリン結合した各分画中のS100A8、S100A9タンパク質の存在をWestern blot 法を用いて検出した結果を示す写真である。

[図39] S100A8、S100A9発現ベクターの図である。

[図40] ボイデン・チャンバーを用いた皮膚抽出液の骨髓由来間葉系幹細胞遊

走能活性測定結果を示す写真である。ポイデン・チャンバーの上槽内から膜上の微細穴を通過してリコンビナントGST-S100A8、GST-S100A9、皮膚抽出液をそれぞれ含む下層側に遊走し、膜下槽側に付着している骨髓間葉系幹細胞を、青色色素にて染色した像である。

[図41] Aはマウスの尾静脈からGST-S100A8、GST-S100A9を投与し、12時間後末梢血中のCD45陰性細胞の画分に対してCD44、PDGFR α 、PDGFR β のFACSを行った図である。また、BはCD45陰性細胞群のうち、左図はCD44陽性、PDGFR α 陽性の細胞群、右図はCD44陽性、PDGFR β 陽性の細胞群それぞれの割合を棒グラフで表現したものである。

[図42] PDGFレセプター α -GFPノックインマウス骨髓由来の付着細胞を抗CD11b MACSビーズを用いてソーティングした後の細胞を示す写真である。CD11b陽性の細胞はほとんどGFPの発現は認められない。CD11b陰性のほぼすべての細胞でGFPの発現が認められる。CD11b陽性細胞はPDGFレセプター α が陰性であり、CD11b陰性細胞はPDGFレセプター α 陽性であることを示す。

[図43] HMGB1はCD11b陽性細胞であるマクロファージに対するマイグレーション活性はほとんど有さず、CD11b陰性細胞である間葉系幹細胞に対してはマイグレーション活性を有することを示す写真である。

[図44] PDGFレセプター α GFPマウスに骨折を作成後、骨折部位における骨髓間葉系細胞の集積をGFPの蛍光（緑色蛍光）によって観察した結果を示す写真である。陰性コントロール投与マウスに比較しHMGB1静脈投与マウスにおいて骨髓間葉系細胞がより多く骨折部位に集まっていることを示す。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明は、以下の（a）から（q）のいずれかに記載の物質を含有する組織再生促進剤であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される薬剤を提供する。

（a）HMGB1タンパク質

（b）HMGB1タンパク質を分泌する細胞

（c）HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

- (d) HMGB2タンパク質
- (e) HMGB2タンパク質を分泌する細胞
- (f) HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (g) HMGB3タンパク質
- (h) HMGB3タンパク質を分泌する細胞
- (i) HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (j) S100A8タンパク質
- (k) S100A8タンパク質を分泌する細胞
- (l) S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (m) S100A9タンパク質
- (n) S100A9タンパク質を分泌する細胞
- (o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (p) 細胞又は組織の抽出液
- (q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

該組織再生促進剤は、再生が必要な組織とは異なる組織に投与されることで、骨髓細胞を骨髓から再生が必要な組織に末梢循環を介して動員（誘導または局所誘導とも表現される）することを特徴とする。ここで、「末梢循環」とは、「血液循環」、「末梢循環血流」とも称される。

[0010] 本発明の組織再生促進剤は、好ましくは、瘢痕治癒を抑制し、非瘢痕性治癒を誘導する。瘢痕治癒とは、線維性コラーゲンで機能性組織が置換されている状態である。一方非瘢痕性治癒とは、損傷部位が細胞成分からなる機能的組織を再生している状態を意味し、瘢痕治癒よりも機能性、審美性の点で優れている。本発明の組織再生促進剤には、このような非瘢痕性組織再生促進剤が含まれる。

[0011] したがって、本発明の薬剤は、組織再生促進剤であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与され、骨髓から骨髓細胞を末梢血中に動員し、末梢循環系を介して、再生が必要な組織に骨髓由来細胞を動員することにより、組織の再生を促進することを特徴とする薬剤、

非瘢痕性組織再生促進剤であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される薬剤、

非瘢痕性組織再生促進剤であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与され、骨髓から骨髓細胞を末梢血中に動員し、末梢循環系を介して、再生が必要な組織に骨髓由来細胞を動員することにより、組織の再生を促進することを特徴とする薬剤とも表現することもできる。

[0012] 再生が必要な組織としては、損傷している組織、壊死している組織、術後組織、機能が低下している組織、線維化している組織、老化した組織、病気の組織等が例示でき、例えば、生体皮膚組織、体内生検（手術）組織（脳、肺、心臓、肝臓、胃、小腸、大腸、膵臓、腎臓、膀胱、脾臓、子宮、精巣や血液など）が例示できる。

本発明において、再生が必要な組織とは異なる組織への投与とは、再生が必要な部位以外の部位（再生が必要な部位とは異なる部位）に投与することを意味する。したがって、「再生が必要な組織とは異なる組織」は、再生が必要な組織とは異なる部位、再生が必要な部位とは異なる部位、再生が必要な組織から離れた部位、再生が必要な部位から離れた部位、再生が必要な部位から遠位にある部位、再生が必要な組織から遠位にある組織、遠位部、遠位組織と表現することもできる。

特に、本発明の薬剤は、体外から直接薬剤を投与することが困難な組織（脳、心臓など）を再生するために、有効に利用される。

[0013] 再生が必要な組織に動員された骨髓由来細胞は、種々の細胞に分化し、再生が必要な組織の機能的再生および機能維持、機能強化に寄与する。本発明において、再生が必要な組織としては、虚血、疎血・低酸素状態に起因する種々の病態、外傷、熱傷、炎症、自己免疫、遺伝子異常などによって損傷した組織が挙げられるが、これら原因に限定されるものではない。

[0014] 本発明における組織としては、骨髓由来細胞が分化可能な組織である限り、特に制限はないが、例えば皮膚組織、骨組織、軟骨組織、筋組織、脂肪組

織、心筋組織、神経系組織、肺組織、消化管組織、肝・胆・膵組織、泌尿・生殖器など、生体内のすべての組織が例示できる。また、上記組織再生促進剤を用いることで、難治性皮膚潰瘍、皮膚創傷、水疱症、脱毛症などの皮膚疾患はもとより、脳梗塞、心筋梗塞、骨折、肺梗塞、胃潰瘍、腸炎、などの再生が必要な組織において、機能的組織再生を誘導する治療が可能となる。上記組織再生促進剤が投与される動物種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。

また、再生が必要な組織とは異なる組織としては、血液組織、筋肉組織、皮下組織、皮内組織、腹腔等が例示できる。

[0015] したがって、本発明の薬剤には、上記組織の再生を促進するための薬剤が含まれる。

本発明の薬剤には、好ましくは、神経組織、骨組織、皮膚組織等の再生促進剤が含まれるが、これらに限定されない。神経組織の再生促進剤としては、中枢神経組織の再生促進剤が挙げられるが、これに限定されない。また、神経組織の再生促進剤は、例えば、脳梗塞、脳出血、脳挫傷等の治療に使用できるが、これらに制限されない。また骨組織の再生促進剤は、例えば、骨折の治療に使用できるが、これに限定されない。また皮膚組織の再生促進剤は、例えば、皮膚潰瘍、手術創の縫合不全、熱傷、切傷、挫傷、皮膚びらん、擦過傷等の治療に使用できるが、これらに制限されない。

[0016] 本明細書において、「骨髄細胞」、「骨髄由来細胞」は、造血系幹細胞及びこれに由来する白血球、赤血球、血小板以外の細胞であり、これまで骨髄間葉系幹細胞あるいは骨髄間質多能性幹細胞あるいは骨髄多能性幹細胞と呼ばれている細胞に代表される幹細胞である。また、「骨髄細胞」は骨髄中に存在する組織前駆細胞集団を含む細胞を含む。「骨髄細胞」、「骨髄由来細胞」は、骨髄採取（骨髄細胞採取）、あるいは末梢血採血により単離するこ

とができる。造血系幹細胞は非付着細胞であるが、「骨髄細胞」、「骨髄由来細胞」の一部は、骨髄採取（骨髄細胞採取）、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。また、「骨髄細胞」、「骨髄由来細胞」は、間葉系幹細胞を含み、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染色陽性などで特定可能）、脂肪細胞（ズダンIII染色陽性で特定可能）、さらには線維芽細胞、平滑筋細胞、ストローマ細胞、腱細胞、などの間葉系細胞、さらには神経細胞、上皮細胞（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を発現する）、血管内皮細胞への分化能力を有することが好ましい。分化後の細胞は上記細胞に限定されるものではなく、肝臓、腎臓、膵臓などの実質臓器細胞への分化能も含む。

本明細書において、「骨髄細胞」とは、骨髄内に存在する細胞を意味し、一方、「骨髄由来細胞」とは、骨髄外に動員された「骨髄細胞」を意味する。

- [0017] 本明細書において、「骨髄間葉系幹細胞」、「骨髄間質多能性細胞」、あるいは「骨髄多能性幹細胞」とは、骨髄内に存在する細胞であって、骨髄から直接あるいはその他の組織（血液や皮膚、脂肪、その他の組織）から間接的に採取され、培養皿（プラスチックあるいはガラス製）への付着細胞として培養・増殖可能であり、骨、軟骨、脂肪などの間葉系組織（間葉系幹細胞）、あるいは骨格筋、心筋、さらには神経組織、上皮組織（多能性幹細胞）への分化能を有するという特徴を持つ細胞であり、骨髄細胞採取によって取得することができる細胞である。また、骨髄から動員された「骨髄間葉系幹細胞」、「骨髄間質多能性細胞」、あるいは「骨髄多能性幹細胞」は、末梢血採血、さらには脂肪など間葉組織、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細胞である。また、骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞、あるいは骨髄から動員されたこれら細胞は、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も有するという特徴も持つ。また、骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞、あるいは骨髄から動員されたこれら細胞としては、CD11b陰性の性質を有する細胞が例示できるが、これに限定されるものではない。

[0018] 骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞、あるいは骨髄から動員されたこれら細胞は、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、膵臓等の実質臓器細胞に分化する能力を有することが好ましいが、分化後の細胞は上記細胞に限定されるものではない。

[0019] また、ヒト骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞、あるいは骨髄から動員されたこれら細胞としては、骨髄採取（骨髄細胞採取）、末梢血採血、脂肪採取によって取得し、直接あるいは単核球分画を分離後に培養して付着細胞として取得できる細胞が例示できるが、これに制限されるものではない。ヒト骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞、あるいは骨髄から動員されたこれら細胞のマーカーとしては、Lin陰性、CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性、CD29陽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。

[0020] また、マウス骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞、あるいは骨髄から動員されたこれら細胞としては、例えば、実施例に記載の方法によって取得できる細胞が例示できるが、これに制限されるものではない。マウス骨髄間葉系幹細胞、骨髄間質多能性幹細胞、骨髄多能性幹細胞

胞、あるいは骨髓から動員されたこれら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、CD29陽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。

[0021] 組織前駆細胞は、血液系以外の特定組織細胞への一方向性分化能を持つ未分化細胞と定義され、上述した間葉系組織、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未分化細胞を含む。

[0022] 本発明の組織再生促進剤において、上記（a）から（q）に記載の物質のうちの少なくとも1つの物質以外の物質としては、骨髓由来細胞の誘導や組織再生促進を阻害しない限り、特に制限はない。例えば、本発明の組織再生促進剤には、上記（a）から（q）に記載の物質のうち少なくとも1つの物質に加え、上記（a）から（q）に記載の物質の機能的組織再生誘導機能を強化する関連分子（群）、上記（a）から（q）に記載の物質の期待される効果以外の作用を抑制する分子（群）、骨髓由来細胞の増殖や分化を制御する因子、これら因子あるいは細胞の機能を強化・維持するその他の因子を含むことが可能である。

[0023] 本発明の組織再生促進剤におけるHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8もしくはS100A9タンパク質、上記抽出液、または上記ヘパリン結合画分の起源となる動物種としては、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、モルモットなどが例示できるが、上記物質が投与される動物種と同じ動物種であることが好ましい。

[0024] 本発明におけるHMGB1タンパク質としては、配列番号：1、3または5に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が例示できるが、これらに限定されるものではない。本発明のHMGB1タンパク質には、配列番号：1、3または5に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質も含まれる。そのようなタンパク質としては、例えば、1）配列番号：1、3または5に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：1、3また

は5に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質、および、2) 配列番号：2、4または6に記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるタンパク質であって、配列番号：1、3または5に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質が挙げられる。

[0025] 本発明におけるHMGB2タンパク質としては、配列番号：7、9または11に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が例示できるが、これらに限定されるものではない。本発明のHMGB2タンパク質には、配列番号：7、9または11に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質も含まれる。そのようなタンパク質としては、例えば、1) 配列番号：7、9または11に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：7、9または11に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質、および、2) 配列番号：8、10または12に記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるタンパク質であって、配列番号：7、9または11に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質が挙げられる。

[0026] 本発明におけるHMGB3タンパク質としては、配列番号：13または15に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が例示できるが、これらに限定されるものではない。本発明のHMGB3タンパク質には、配列番号：13または15に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質も含まれる。そのようなタンパク質としては、例えば、1) 配列番号：13または15に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：13または15に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質、および、2) 配列番号：14または16に記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされる

タンパク質であって、配列番号：１３または１５に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質が挙げられる。

[0027] 本発明におけるS100A8タンパク質としては、配列番号：１７、１９または２１に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が例示できるが、これらに限定されるものではない。本発明のS100A8タンパク質には、配列番号：１７、１９または２１に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質も含まれる。そのようなタンパク質としては、例えば、１）配列番号：１７、１９または２１に記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：１７、１９または２１に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質、および、２）配列番号：１８、２０または２２に記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるタンパク質であって、配列番号：１８、２０または２２に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質が挙げられる。

[0028] 本発明におけるS100A9タンパク質としては、配列番号：２３、２５または２７に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が例示できるが、これらに限定されるものではない。本発明のS100A9タンパク質には、配列番号：２３、２５または２７に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質も含まれる。そのようなタンパク質としては、例えば、１）配列番号：２３、２５または２７に記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：２３、２５または２７に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質、および、２）配列番号：２４、２６または２８に記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるタンパク質であって、配列番号：２３、２５または２７に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質が挙げられる。

[0029] 配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等な単離されたタンパク質は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質のホモログあるいはパラログでありうる。配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、当業者によって公知の方法（実験医学別冊・遺伝子工学ハンドブック，pp246-251、羊土社、1991年発行）で単離することができる。

配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質としては、骨髓由来細胞を再生が必要な組織に動員する活性を有するタンパク質、又は骨髓由来細胞を遊走する活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0030] 配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、天然に存在するタンパク質を含む。一般に真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象 (polymorphism) を有する。この多型現象によって生じた塩基配列の変化によって、1または複数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および／または付加される場合がある。このように自然に存在するタンパク質であって、かつ配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25また

は27に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、本発明のHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質に含まれる。

[0031] また、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質である限り、人為的に作製された変異タンパク質も本発明に含まれる。与えられた塩基配列に対してランダムに変異を加える方法としては、たとえばDNAの亜硝酸処理による塩基対の置換が知られている（Hirose, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:7258-7260, 1982）。この方法では、変異を導入したいセグメントを亜硝酸処理することにより、特定のセグメント内にランダムに塩基対の置換を導入することができる。あるいは、目的とする変異を任意の場所にもたらす技術としてはgapped duplex法等がある（Kramer W. and Fritz HJ., Methods in Enzymol., 154:350-367, 1987）。変異を導入すべき遺伝子をクローニングした環状2本鎖のベクターを1本鎖とし、目的とする部位に変異を持つ合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる。制限酵素により切断して線状化させたベクター由来の相補1本鎖DNAを、前記環状1本鎖ベクターにアニールさせ、前記合成ヌクレオチドとの間のギャップをDNAポリメラーゼで充填し、更にライゲーションすることにより完全な2本鎖環状ベクターとする。

改変されるアミノ酸の数は、典型的には50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）であると考えられる。

[0032] アミノ酸を人為的に置換する場合、性質の似たアミノ酸に置換すれば、もとのタンパク質の活性が維持されやすいと考えられる。本発明のタンパク質には、上記アミノ酸置換において保存的置換が加えられたタンパク質であって、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。保存的置換は、タンパク質の活性に重要なド

メインのアミノ酸を置換する場合などにおいて重要であると考えられる。このようなアミノ酸の保存的置換は、当業者にはよく知られている。

- [0033] 保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などが挙げられる。

また、非保存的置換によりタンパク質の活性などをより上昇（例えば恒常的活性化型タンパク質などを含む）させることも考えられる。

- [0034] この他、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得る方法として、ハイブリダイゼーションを利用する方法を挙げることができる。すなわち、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26または28に示すような本発明によるHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードするDNA、あるいはその断片をプローブとし、これとハイブリダイズすることができるDNAを単離する。ハイブリダイゼーションをストリンジেন্টな条件下で実施すれば、塩基配列としては相同性の高いDNAが選択され、その結果として単離されるタンパク質にはHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる可能性が高まる。相同性の高い塩基配列とは、たとえば70%以上、望ましくは90%以上の同一性を示すことができる。

- [0035] なおストリンジेंटな条件とは、具体的には例えば 6×SSC、40%ホルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55℃での洗浄といっ

た条件を示すことができる。ストリンジェンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度といった条件に左右されるが、当業者であればこれらの条件を必要なストリンジェンシーを得られるように設定することは自明である。

ハイブリダイゼーションを利用することによって、たとえば配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質以外のHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質のホモログをコードするDNAの単離が可能である。

[0036] 配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも30%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を指す。塩基配列やアミノ酸配列の同一性は、インターネットを利用したホモロジー検索サイトを利用して行うことができる [例えば日本DNAデータバンク (DDBJ) において、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、および SSEARCH 等の相同性検索が利用できる [例えば日本DNAデータバンク (DDBJ) のウェブサイトの相同性検索 (Search and Analysis) のページ ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>] 。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI) において、BLASTを用いた検索を行うことができる (例えばNCBIのホームページのウェブサイトのBLASTのページ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10 ; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402) 。] 。

[0037] 例えば Advanced BLAST 2.1におけるアミノ酸配列の同一性の算出は、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBL

OSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、および Lambda ratioをそれぞれ 11、1、0.85（デフォルト値）に設定して検索を行い、同一性（identity）の値（%）を得ることができる（Karlin, S. and S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin, S. and S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7）。

- [0038] また、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27に記載のアミノ酸配列の断片であってもよい。
- [0039] 本発明によるタンパク質、またはその機能的に同等なタンパク質は、糖鎖等の生理的な修飾、蛍光や放射性物質のような標識、あるいは他のタンパク質との融合といった各種の修飾を加えたタンパク質であることができる。ことに後に述べる遺伝子組換え体においては、発現させる宿主によって糖鎖による修飾に差異が生じる可能性がある。しかしたとえ糖鎖の修飾に違いを持っていても、本明細書中に開示されたHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質と同様の性状を示すものであれば、いずれも本発明によるHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質、または機能的に同等なタンパク質である。
- [0040] HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質は、生体材料のみならず、これをコードする遺伝子を適当な発現系に組み込んで遺伝子組換え体（recombinant）として得ることもできる。HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質を遺伝子工学的な手法によって得るためには、先に述べたHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードするDNAを適当な発現系に組み込んで発現させれば良い。本発明に応用可能なホスト／ベクター系としては、例えば、発現ベクターpGEX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、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ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HMGB1、GST融合HMGB2、GST融合HMGB3、GST融合S100A8またはGST融合S100A9タンパク質の発現を誘導する。本発明による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。

[0041] HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質の recombinant 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、ヒスチジインタグ、HAタグ、FLAG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、本発明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。

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HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質の発現系として利用することができる。また、レトロウイルスベクター、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。

[0042] 得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質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、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

[0043] 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。

[0044] また、本発明のタンパク質は、実質的に精製されたタンパク質であることが好ましい。ここで「実質的に精製された」とは、本発明のタンパク質の精製度（タンパク質成分全体における本発明のタンパク質の割合）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。

[0045] 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タンパク質に含まれる。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タンパク質を例示できるが、これらに限定されるものではない。

[0046] 本発明におけるHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質を放出または分泌する細胞としては、基本的に生体内のすべての組織由来細胞が該当する。採取および培養が容易な細胞としては、線維芽細胞（例えば正常皮膚線維芽細胞およびそれに由来する株化細胞）が例示できるが、これに限定されるものではない。また、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質を分泌する細胞は、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タン

パク質をコードするDNA、あるいは、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードするDNAに分泌シグナルをコードするDNA（ATG CAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTG TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC；配列番号：29）を結合させたDNAを、公知の発現ベクターや遺伝子治療用ベクターに挿入することで作製されたベクターを、線維芽細胞（例えば正常皮膚線維芽細胞およびそれに由来する株化細胞）などの哺乳類細胞や昆虫細胞、その他の細胞に導入することによっても作製することができる。分泌シグナルをコードするDNAとしては上述の配列を有するDNAが例示されるが、これに限定されない。また、これら細胞が由来する動物種に特に制限はないが、ベクターが投与される対象動物種の細胞、対象自身の細胞、あるいはベクターが投与される対象の血縁にあたる者に由来する細胞を使用することが好ましい。

[0047] 本発明におけるHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードするDNAは、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードする限り、cDNAであっても、ゲノムDNAであってもよく、また、天然のDNAであっても、人工的に合成されたDNAであってもよい。HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードするDNAは、通常、ベクターに挿入された状態で、投与される。

[0048] 本発明におけるベクターとしては、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、アデノアソシエートウイルスベクター、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、などが例示できるが、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。

[0049] なお、本発明においては、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質の部分ペプチドであって骨髓由来細胞の動員活性を有するペプチド、該部分ペプチドを分泌する細胞、または、該部分ペプチドをコードするDNAが

挿入されたベクターを利用することもできる。

[0050] 本発明における細胞又は組織の抽出液は、細胞又は組織を溶媒に浸す工程を含む方法で製造することができる。

溶媒に浸される細胞又は組織としては、特に制限はないが、組織由来細胞、組織由来細胞から樹立された株化細胞（例えば、HeLa、HEK293が例示できるが、これらに制限されない）、単離された細胞、単離されていない細胞（例えば単離された組織中に存在する細胞）、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8またはS100A9タンパク質をコードするDNAが導入された細胞などが例示できる。上記組織としては、どのような組織でもよく、例えば、生体皮膚組織、体内生検（手術）組織（脳、肺、心臓、肝臓、胃、小腸、大腸、膵臓、腎臓、膀胱、脾臓、子宮、精巣や血液など）が例示できるが、これらに制限されるものではない。

[0051] 上記溶媒としては生理食塩水、PBS（Phosphate-buffered saline）、TBS（Tris-buffered saline）が例示できるが、これらに制限されない。また、細胞や組織を溶媒に浸す時間としては、細胞壊死が誘導されるために必要・十分な時間、すなわち1時間から48時間（例えば6時間から48時間）、好ましくは12時間から24時間であるが、この時間に限定されるものではない。よって、「細胞を溶媒に浸す工程」は「壊死が誘導されるために必要・十分な時間、細胞を溶媒に浸す工程」や「細胞を壊死させる工程」と言い換えることができる。また、細胞や組織を溶媒に浸す温度としては4℃から25℃（例えば4℃から8℃）、好ましくは4℃が例示できるが、これに制限されない。また、細胞や組織を溶媒に浸すpHとしてはpH7から8、好ましくはpH7.5が例示できるが、これに制限されない。また、緩衝液の成分として、10 mM～50 mM、好ましくは10～20 mMの濃度のリン酸緩衝液が挙げられるが、これに制限されない。

[0052] また、本発明においては、細胞や組織を溶媒に浸した後に、細胞や組織を含む溶媒から該細胞や該組織を取り除くこともできる。溶媒から細胞や組織を取り除く方法は当業者に周知な方法であれば、特に制限されない。例えば

、4°C～25°C（例えば4°C）、また重力加速度10G～10000G（例えば40G）で遠心し、上清を分取することにより、溶媒から細胞や組織を取り除くことができるが、これに制限されない。該上清を細胞や組織の抽出液として利用できる。

[0053] 本発明における細胞又は組織の抽出液としては、例えば、皮膚抽出液や末梢血単核球抽出液（末梢血抽出液）が挙げられるが、これらに制限されない。

末梢血抽出液の調整方法は、注射器などを用いて採血した後、冷凍庫や液体窒素、ドライアイスなどで細胞を凍結し、その後0°C以上の温度下で再融解する。さらに、細胞の不溶成分を取り除くために、例えば、4°C～25°C（例えば4°C）、重力加速度10G～10000G（例えば40G）で遠心し、上清を分取することにより、溶媒から細胞の不溶成分を取り除くことができるが、これに制限されない。該上清を細胞や組織の抽出液として利用できる。細胞の不溶成分を除去するためには、遠心操作の代わりに、0.45μmの微少の孔をもつニトロセルロースフィルターなどを通して、不溶成分を取り除くことができる。また、採血した末梢血を3時間から48時間4°Cの状態に置くことで、細胞の壊死を誘発し、末梢血中の細胞から細胞内成分を分泌させることができる。この後重力加速度10G～10000G（例えば40G）で遠心し、上清を分取することにより、溶媒から細胞の不溶成分を取り除くことができるが、これに制限されない。該上清を細胞や組織の抽出液として利用できる。また末梢血単核球から細胞抽出液を調整する方法は、注射器などを用いて末梢血全血を採取した後PBSにて全量を4mLに希釈し、遠心管にFicoll-Paque Plus (GE) 液を3mL 挿入後その上に希釈血液を重ねる。400G（18°C）で40分間遠心し、単核球を含む中間層を新しい遠心管に回収し、45 mL のPBSを加え800G（18°C）で5分遠心し上清を除去する。さらにもう一度45 mL の

[0054]

PBSを加え800G(18°C)で5分遠心し上清を除去する。沈殿した細胞に200 μ LのPBSを加え懸濁する。細胞懸濁液は-80°Cの冷凍庫内において30分間凍結し、冷凍庫から氷上で融解する。この凍結融解の操作を3回繰り返す。さらに800G(4°C)で15分遠心して上清を回収する。細胞を凍結する代わりに、4°Cの冷蔵庫に3時間から48時間置くことで細胞の壊死を誘発し細胞内成分を分泌させることができる。また、氷上で冷却しながら、超音波処理を行うことで細胞を破壊し細胞内成分を細胞外へ出すことができる。いずれの場合も細胞内成分を細胞外へ出した後、重力加速度440Gから1000000G、好ましくは100000Gから20000Gで遠心操作をおこないその上清を回収して細胞抽出液とする。また、遠心操作の代わりに、0.45 μ mの微少の孔をもつニトロセルロースフィルターもしくはセルロースアセテートなどを通過させることで、不溶成分を取り除き細胞抽出液とすることができる。

[0055] 本発明における細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分は、以下の工程を含む方法で製造することができる。

(a) 細胞又は組織を溶媒に浸す工程、

(b) 工程(a)で得られる抽出液を固定化ヘパリンに接触させる工程、
および

(c) 固定化ヘパリンからヘパリン結合画分(ヘパリン精製画分、ヘパリンカラム精製画分とも表現しうる)を溶出する工程

固定化ヘパリンとは、ヘパリンを不溶性担体に共有結合させたものである。上記不溶性担体としては、Sephacrose beads(Sephacrose 4B, Sepharose 6B等:GE Healthcare)が例示されるが、これに制限されるものではない。本発明においては、市販の固定化ヘパリン(Hitrap Hepalin HP column: GE Healthcare)を用いてもよい。

細胞や組織の抽出液と固定化ヘパリンの接触条件としては、pH7~8程度(好ましくはpH7.5)、塩濃度は0~200mM、好ましくは100~200mM程度が例示されるが、これらに制限されない。抽出液と固定化ヘパリンとが接触している時間は特に限定されないが、ヘパリン結合画分を固定化ヘパリンに十分吸着

させるという観点では5分以上保持されることが好ましい。また、温度としては、4～8℃、好ましくは4℃が挙げられるが、これらに制限されない。さらに、固定化ヘパリンに吸着したヘパリン結合画分の溶出条件としては、pH7～8程度、塩濃度200～1000mM（好ましくは1000mM程度）が例示されるが、これらに制限されるものではない。

[0056] 本発明の組織再生促進剤の投与方法は、非経口投与が挙げられ、係る投与方法としては具体的には、注射投与などが挙げられるが、この方法に限定されない。また、本発明の組織再生促進剤の投与方法としては、組織再生促進剤が投与部位に留まらずに、血液循環に入る投与方法であれば、特に制限されない。本発明の組織再生促進剤の投与方法としては、例えば、血管内投与（動脈内投与、静脈内投与等）、血液内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与が例示されるが、これらに限定されない。

[0057] 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。HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質を投与する場合、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。HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質を分泌する細胞やHMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質をコードする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、再生が必要な組織において、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質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、本発明の組織再生促進剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0058] 本発明の組織再生促進剤は、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、着香料、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。

[0059] 本発明はまた、以下の（a）から（q）のいずれかに記載の物質を含有する組成物を含む、組織再生促進キットであって、該組成物が、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される前記キットを提供する。

- （a）HMGB1タンパク質
- （b）HMGB1タンパク質を分泌する細胞
- （c）HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （d）HMGB2タンパク質
- （e）HMGB2タンパク質を分泌する細胞
- （f）HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （g）HMGB3タンパク質
- （h）HMGB3タンパク質を分泌する細胞
- （i）HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （j）S100A8タンパク質
- （k）S100A8タンパク質を分泌する細胞
- （l）S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （m）S100A9タンパク質
- （n）S100A9タンパク質を分泌する細胞
- （o）S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- （p）細胞又は組織の抽出液
- （q）細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

該組織再生促進用キットは、再生が必要な組織とは異なる組織に投与されることで、骨髓細胞を骨髓から再生が必要な組織に末梢循環を介して動員することを特徴とする。

また、本発明のキットには、上記再生が必要な組織を治療するためのキットが含まれる。好ましくは、本発明のキットには、非経口投与されるキット、さらに好ましくは注射投与されるキットが含まれる。また、本発明のキットには、好ましくは、血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与されるキットが含まれる。

また、好ましくは、本発明のキットには、神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生促進に用いられるキットが含まれる。

組織再生促進用キットとしては、（１）フィブリノゲンに溶解した上記物質、および（２）トロンビンを含む組織再生促進用キット、または、（１）上記物質、（２）フィブリノゲン、および（３）トロンビンを含む組織再生促進用キットが例示できる。本発明においては、市販のフィブリノゲンやトロンビンを使用することができる。例えば、フィブリノゲンHT-Wf（ベネシー三菱ウェルファーマー）、ベリプラスト（ZLBベ어링）、ティシール（バクスター）、ボルヒール（化血研）、タココンブ（ZLBベ어링）が挙げられるが、これらに制限されるものではない。

[0060] また、上述した細胞又は組織の抽出液、細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質を分泌する細胞、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター、HMGB1、HMGB2、HMGB3、S100A8、またはS100A9タンパク質の部分ペプチド、該部分ペプチドを分泌する細胞、または該部分ペプチドをコードするDNAが挿入されたベクターの用途は、以下（１）～（３）のように表現することもできる。

（１）以下の（a）から（q）のいずれかに記載の物質を含有する組成物を、再生が必要な組織とは異なる組織にその有効量を投与する工程を含む、組

組織の再生を促進する方法；

- (a) HMGB1タンパク質
- (b) HMGB1タンパク質を分泌する細胞
- (c) HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (d) HMGB2タンパク質
- (e) HMGB2タンパク質を分泌する細胞
- (f) HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (g) HMGB3タンパク質
- (h) HMGB3タンパク質を分泌する細胞
- (i) HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (j) S100A8タンパク質
- (k) S100A8タンパク質を分泌する細胞
- (l) S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (m) S100A9タンパク質
- (n) S100A9タンパク質を分泌する細胞
- (o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (p) 細胞又は組織の抽出液
- (q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

(2) 組織再生促進剤の製造における以下の(a)から(q)のいずれかに記載の物質を含有する組成物の使用であって、該組織再生促進剤が、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される、前記使用；

- (a) HMGB1タンパク質
- (b) HMGB1タンパク質を分泌する細胞
- (c) HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (d) HMGB2タンパク質
- (e) HMGB2タンパク質を分泌する細胞
- (f) HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
- (g) HMGB3タンパク質

- (h) HMGB3タンパク質を分泌する細胞
 - (i) HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (j) S100A8タンパク質
 - (k) S100A8タンパク質を分泌する細胞
 - (l) S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (m) S100A9タンパク質
 - (n) S100A9タンパク質を分泌する細胞
 - (o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (p) 細胞又は組織の抽出液
 - (q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。
- (3) 組織の再生を促進する方法に使用するための、以下の(a)から(q)のいずれかに記載の物質を含有する組成物であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される、前記組成物；
- (a) HMGB1タンパク質
 - (b) HMGB1タンパク質を分泌する細胞
 - (c) HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (d) HMGB2タンパク質
 - (e) HMGB2タンパク質を分泌する細胞
 - (f) HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (g) HMGB3タンパク質
 - (h) HMGB3タンパク質を分泌する細胞
 - (i) HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (j) S100A8タンパク質
 - (k) S100A8タンパク質を分泌する細胞
 - (l) S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - (m) S100A9タンパク質
 - (n) S100A9タンパク質を分泌する細胞
 - (o) S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター

(p) 細胞又は組織の抽出液

(q) 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。

[0061] 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。

実施例 1

[0062] HMGB-1の精製、およびS100A8の精製

新生マウス皮膚からTrizol (Invitrogen) を用いてRNAを抽出し、更にSuperScript III cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いてcDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとしてHMGB1のcDNAをPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いて増幅し、精製のためにアミノ酸配列のN末端にGST tagおよび6XHis tagの配列を付加したタンパクを発現するように、哺乳類細胞でタンパクを発現させるプラスミドベクターpCAGGSに挿入した。

ヒト胎児腎細胞由来HEK293培養細胞株にポリエチレンジイミン (PEI) を用いてpCAGGS-GST-His-HMGB1をトランスフェクションし、48時間後細胞及び培養上清を回収した。細胞及び培養上清は4℃で4400g・5分間遠心し、上清と細胞を分離しそれぞれ回収した。回収した上清はさらに直径0.8 μ m孔をもつセルロースアセテートフィルターを通過させた後、0.45 μ mの孔を持つニトロセルロースフィルターを通過させ、それにより不溶画分を除去したサンプルを調整した。本サンプルを、50mM NaCl 含50mM Tris HCl pH8.0 (50mL) で平衡化した5 mL HisTrap FF (GE) に挿入し、吸着成分をさらに、10mM イミダゾール含有50mM NaCl 50mM Tris HCl pH8.0で洗浄して非特異的吸着成分を除去した。特異的吸着成分を、カラムから、100mM イミダゾール含有50mM NaCl 50mM Tris HCl pH8.0で溶出した。吸着画分はそれぞれ、500 μ Lずつシリコンコートしたプラスチックチューブに分画し、タンパク含有フラクションをまとめた後、脱塩カラムPD10 (GE) を用いてイミダゾールを除去し、50mM Tris HCl pH. 7.5, 150mM NaCl を用いて溶出した。溶出したサンプルにHRV3C (Novagen) を添加し、4℃、8時間反応させた。切断後、サンプルを50mM Tris HCl pH. 7.5, 150 mM NaClで平衡化したHiTrap Heparin 1 mL カラム (GE) に結合させ、50

mM Tris HCl pH. 7.5, 150 mM NaClでカラム内部を洗浄後、50mM Tris HCl pH. 7.5, 1000 mM NaClで結合タンパク質を溶出した。溶出したサンプルは50mM Tris HCl pH. 8.8 20mM NaClにて50倍希釈し同じバッファーで平衡化した1mL HiTrap Q FF (GE)に吸着させた。50mM Tris HCl pH. 8.8 500mM NaClを使用しNaClの濃度を徐々に上昇させることで吸着タンパク質を溶出した。ニッケルカラム、ヘパリンカラム、Qカラムに結合したタンパク質はSDS-PAGEシクマシーブリリアントブルー染色を行いタンパク質の存在を確認した。

その結果、図1に示すように、高純度のHMGB-1が精製された。以降の実施例では本精製方法を使用したHMGB-1を使用する。

[0063] 新生マウス皮膚からTrizol (Invitrogen) を用いてRNA を抽出し、更にSuperScript III cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いてcDNA を合成した。このcDNA をテンプレートとしてS100A8のcDNAをPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いて増幅し、アミノ酸配列のN末端にGST tagの配列 (配列番号 : 31 (アミノ酸配列)、配列番号 : 32 (DNA配列)) を付加したタンパク質を発現するように、哺乳類細胞でタンパク質を発現させるプラスミドベクターpCAGGSに挿入した (図39)。

ヒト胎児腎細胞由来HEK293培養細胞株にリポフェクション試薬 (Invitrogen) を用いてpCAGGS-GST-S100A8をトランスフェクションし、48時間後細胞及び培養上清を回収した。細胞及び培養上清は4°Cで4400g・5分間遠心し、上清 (上清A) と細胞を分離しそれぞれ回収した。細胞は0.1%Tween20含PBSを加え氷冷下で30秒間超音波をあてることで細胞膜を破壊した。さらに、4°Cで4400g・5分間遠心し、上清を回収した (上清B)。上清Aおよび上清Bを混合し、あらかじめ30mLのPBSでバッファーを置換したHiTrap GST FF column (GE healthcare, 5mL) に添加した。添加後PBS100mLでカラムを洗浄し、還元型グルタチオン含20mMリン酸バッファー (pH. 8) で吸着したタンパク質を溶出した。グルタチオンを除くために、ゲル濾過カラムPD-10 (GE社製) にてバッファーをPBSに置換した。

実施例 2

[0064] 皮膚潰瘍部位治癒過程における、HMGB-1およびS100A8の静脈内投与による骨髄由来細胞の皮膚潰瘍部への動員効果

C57BL/6雄マウス（6週齢）に致死量放射線（10Gy）を照射し、その直後に尾静脈よりGFP（green fluorescent protein）トランスジェニックマウス（Okabe M. et al, FEBS Lett. 407, 313-319, 1997）由来骨髄細胞（ 5×10^6 個/0.1ml 生理的リン酸緩衝溶液pH7.4）を移植した。8週間後、背部に直径6mmの円形の皮膚潰瘍を作製した。マウスの皮膚が収縮することを防ぐため、シリコン製の外径10mm内径6mm厚さ1mmの円盤を両面粘着テープおよび医療用接着剤アロンアルファA（三共）を用いて潰瘍部に接着した。潰瘍部分の乾燥と細菌感染を防ぐため直径10mm厚さ1mmのシリコン製の円盤で潰瘍部を覆った。潰瘍部を保護するため、テガダーム（3M）で被覆した。

皮膚潰瘍作製当日から24時間間隔で5回尾静脈からHMGB-1（40 μ g）もしくはS100A8（250ng）を投与した。潰瘍作製から2週間後、マウスにイソフルランを用いて吸入麻酔した後、背部に作製した皮膚潰瘍作製部分のGFP蛍光の集積程度を蛍光実体顕微鏡使用して観察した。さらに、皮膚潰瘍作製部分の皮膚を円形に切除し4%パラホルムアルデヒド含PBS（リン酸緩衝液, nacalai）で固定し、OCTコンパウンドに包埋後冷却装置付ミクロトーム（Leica）を使用して8マイクロメートルの薄切切片を作製した。切片をプレパラートに貼り付けた後、PBSにてコンパウンドを洗浄し、核をDAPIによって染色した。さらにPBSにて余剰のDAPIを洗浄し、蛍光退色防止剤入り封入材を用いて封入した。それぞれのサンプルについて蛍光顕微鏡を用いてGFPの蛍光を検出した。

[0065] 結果を図2に示す。コントロールと比較して、HMGB-1・S100A8投与マウスにおいて、骨髄由来細胞（GFP陽性細胞）が皮膚潰瘍閉鎖後の真皮、特に上層に多数集まっていることが確認できた。

[0066] 骨髄多能性幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等に分化可能であるが、皮膚組織においては、表皮細胞、毛包系細胞、真皮線維芽細胞などに分化可能であると考えられている。HMGB-1およびS100A8は骨髄多能性幹細胞を動員する活性を有すること、またHMGB-1およびS100A8を皮膚潰瘍部位に直接

投与したマウスにおいて皮膚潰瘍縮小の効果は明らかになっているが、今回の結果によってはじめて、皮膚潰瘍部に対して遠位かつ異所である静脈血内にHMGB-1もしくはS100A8を投与する事によって皮膚潰瘍部位に骨髓由来細胞を動員することが明らかになった。

実施例 3

[0067] HMGB-1およびS100A8の静脈内投与による皮膚潰瘍治癒促進効果

C57BL/6雄マウス（8週齢）に背部に直径6mmの円形の皮膚潰瘍を作製した。マウスの皮膚が収縮することを防ぐため、シリコン製の外径10mm内径6mm厚さ1mmの円盤を両面粘着テープおよび医療用接着剤アロンアルファA（三共）を用いて潰瘍部に接着した。潰瘍部分の乾燥と細菌感染を防ぐため直径10mm厚さ1mmのシリコン製の円盤で潰瘍部を覆った。潰瘍部を保護するため、テガダーム（3M）で被覆した。

皮膚潰瘍作製当日から24時間間隔で尾静脈からHMGB-1 (40 μ g) もしくはS100A8 (250ng) を計五回投与した。潰瘍作成後3日目、5日目、10日目の潰瘍部分の面積を計測した。

[0068] 結果を図3に示す。HMGB-1は陰性コントロール（PPS投与）と比較して潰瘍作成後3日目から潰瘍面積の縮小が認められた。また、S100A8は陰性コントロール（PPS投与）と比較して潰瘍作成後7日目から潰瘍面積の縮小が認められた。

[0069] これまでHMGB-1およびS100A8を皮膚潰瘍部に直接投与する事によって、皮膚潰瘍の治癒促進効果を得ていたが、本研究によってはじめて潰瘍部位から遠位かつ異所である血管内に投与する事で皮膚潰瘍の治癒を促進することに成功した。本発明によって直接潰瘍部分に投与することなく皮膚潰瘍の治癒を行うことが可能になるため、広範囲の皮膚潰瘍、皮膚欠損や感染巣や壊死巣を伴う潰瘍など、直接潰瘍部分に投与することが困難な状態にも使用することが可能な医薬品を開発することが可能になった。

実施例 4

[0070] HMGB-1静脈内投与による皮膚潰瘍の非瘢痕性治癒促進効果

C57BL/6雄マウス（8週齢）に背部に直径6mmの円形の皮膚潰瘍を作製した。マウスの皮膚が収縮することを防ぐため、シリコン製の外径10mm内径6mm厚さ1mmの円盤を両面粘着テープおよび医療用接着剤アロンアルファA（三共）を用いて潰瘍部に接着した。潰瘍部分の乾燥と細菌感染を防ぐため直径10mm厚さ1mmのシリコン製の円盤で潰瘍部を覆った。潰瘍部を保護するため、テガダーム（3M）で被覆した。

皮膚潰瘍作製当日から24時間間隔で尾静脈からHMGB-1 (40 μ g) を計五回投与した。潰瘍作成後4週後の潰瘍部分を採取し10%緩衝ホルムアルデヒドで固定した。サンプルをパラフィン包埋した後、ミクロトームを使用して薄切切片を作製した。脱パラフィン後HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色、およびMT（マッソン・トリクローム）染色を行った。

[0071] 結果を図4に示す。HMGB-1を投与したマウス皮膚では、コントロールマウス（PBS投与）と比較して、マッソン・トリクローム染色陽性部分が真皮上層に強く認められた。

[0072] 皮膚潰瘍の治癒過程において、皮膚組織の再構成が充分に行われない場合、瘢痕治癒によって潰瘍の閉鎖が行われることが知られている。瘢痕治癒は、線維芽細胞などから分泌される膠原線維などの非細胞成分による潰瘍部分の閉鎖であるが、正常の組織と違い機能性組織構築を持たないため、治癒後も組織の硬化、ひきつれなどを伴い機能面、美容面において瘢痕の抑制は重要な課題である。今回の結果からHMGB-1を静脈内投与することによって、骨髓由来細胞を潰瘍部分に動員し皮膚潰瘍の早期閉鎖と非瘢痕性治癒を促進することが可能になった。

実施例 5

[0073] HMGB-1を静脈内投与された脳梗塞モデル動物脳における骨髓由来細胞の確認

GFP骨髓移植マウスに脳梗塞を作成した（中大動脈塞栓系モデル）。具体的には、上述の実施例の方法で作成したGFP骨髓移植マウスにイソフルランを用いて吸入麻酔を行った後、頭部皮膚を切開し、頭蓋骨に直接レーザードップラー血流計プローブを接着し脳血流を確認した。さらに胸骨から下顎まで正中

皮膚を切開し、右総頸動脈を剥離し4号絹糸を用いて緩く結紮した。右外頸動脈の遠位部に6号絹糸をかけて結紮した。総頸動脈の糸に緊張を加えながら右外頸動脈近位部に穴を開けて、先端700 μ mを加熱成形した6号モノフィラメントナイロン糸（塞栓糸）を挿入した。内頸動脈に向けて塞栓糸を進め、塞栓糸の先端から約8 mmまで挿入した部位で総頸動脈糸をゆるめた。レーザードップラー血流計によって血流遮断前後で血流計の数値が10分の1になることを確認した。

血流遮断30分後に塞栓糸を抜去し血流を回復させた。12時間後、精製HMGB-1 (100 μ g) を500 μ LのPBSに希釈して作製した疾患モデルマウスの尾静脈から投与した。以後4回24時間おきに同様にHMGB-1を投与した。コントロールマウスにはPBSを投与した。

治療最終日から2週間後、イソフルランによる吸入麻酔下で2%パラホルムアルデヒドを使用して灌流固定を行った。脳を頭蓋骨から取り出し10%スクロース液に12時間、20%スクロース液に24時間浸透させて脳組織から脱水を行った。脱水後OTC コンパウンド内に投入し、ドライアイス上で凍結させブロックを作製した。ブロックは凍結切片用のミクロトームを使用して厚さ8 μ mの切片を作製し、シランコーティングのプレパラート上に伸展した。伸展後十分に乾燥させ、PBSを用いてコンパウンドを洗浄した。

2%スキムミルク含PBSをサンプルに浸透させた後、2%スキムミルク含PBSに抗マウスNestin 抗体および β III Tubulin抗体を500倍に希釈しサンプルに4℃で8時間浸透させた。PBSにて5分間ずつ5回十分に洗浄した後、2%スキムミルク含PBS で500倍に希釈したPE 標識抗ラットIgG抗体をサンプルに室温で1時間浸透させた。同様にPBSにて十分に洗浄した後DAPI溶液を室温で10分間浸透させ、PBSで十分に洗浄した。蛍光消退防止剤含有封入剤で封入後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、GFP・DAPI・PEの蛍光を観察した。

[0074] 結果を図5に示す。HMGB-1投与マウスの脳において、骨髄由来細胞（GFP陽性細胞）が多数認められ、一部に骨髄由来細胞かつNestin陽性細胞（右図黄色の細胞）や骨髄由来細胞かつ β III tubulin 陽性細胞（左図黄色の細胞）が

認められた。PBS投与群では、骨髄由来細胞は認められたが、Nestinや β III-tubulinを同時に発現している細胞は認められなかった（写真は示さず）。

[0075] 骨髄由来細胞がin vitro（培養系）において神経細胞に分化することは知られている。また、in vivo（生体内）においても骨髄由来細胞が、脳内において神経マーカーをまれに発現することが知られているが、脳神経としての機能を保有しているかは明らかではない。一方、骨髄間葉系幹細胞などの非炎症系骨髄細胞を脳梗塞の病態に対して投与することで治療効果があることが確認されているが、治癒メカニズムは明らかではない。

本結果から、脳梗塞作製後HMGB-1を静脈投与したマウスにおいて、神経細胞マーカーを発現する骨髄由来細胞を脳内に認めた。これらのGFP陽性細胞の由来は、骨髄間葉系幹細胞などの非炎症系細胞に由来すると予想される。

実施例 6

[0076] HMGB-1投与による脳梗塞巣の縮小効果

8週齢C57/Bl6 メスマウスにイソフルランを用いて吸入麻酔を行った後、頭部皮膚を切開し、頭蓋骨に直接レーザードップラー血流計プローブを接着し脳血流を確認した。さらに胸骨から下顎まで正中皮膚を切開し、右総頸動脈を剥離し4号絹糸を用いて緩く結紮した。右外頸動脈の遠位部に6号絹糸をかけて結紮した。総頸動脈の系に緊張を加えながら右外頸動脈近位部に穴を開けて、先端700 μ mを加熱成形した6号モノフィラメントナイロン糸（塞栓糸）を挿入した。内頸動脈に向けて塞栓糸を進め、塞栓糸の先端から約8 mmまで挿入した部位で総頸動脈系をゆるめた。レーザードップラー血流計によって血流遮断前後で血流計の数値が10分の1になることを確認した。

血流遮断30分後に塞栓糸を抜去し血流を回復させた。12時間後、精製HMGB1（10 μ g）を500 μ LのPBSに希釈し、作製した疾患モデルマウスの尾静脈から投与した。以後4回24時間おきに同様にHMGB-1を投与した。コントロールマウスにはPBSを投与した。

治療最終日から5日後、イソフルランによる吸入麻酔下で2%パラホルムアルデヒドを使用して灌流固定を行った。脳を頭蓋骨から取り出し、脱水後OTC

コンパウンド内に投入し、ドライアイス上で凍結させブロックを作製した。ブロックは凍結切片用のミクロトームを使用して厚さ $8\mu\text{m}$ の切片を作製し、シランコーティングのプレパラート上に伸展した。伸展後十分に乾燥させ、PBSを用いてコンパウンドを洗浄した。4%パラホルムアルデヒド含PBSにて10分間固定した後、リン酸緩衝液で5分間洗浄し、蒸留水にて10分間浸透させた。さらに0.5%クレシルバイオレット溶液にて13分間染色した。蒸留水で1分間洗浄した後、50%エタノール、75%エタノール、95%エタノール、100%エタノール、にそれぞれ10秒浸透させた後キシレンに2分間浸透させることを2回繰り返した。さらにエンテラン液を用いて封入した。

[0077] 結果を図6に示す。PBS投与マウスと比較して、HMGB-1投与マウスにおいて、脳梗塞巣において顕著な改善効果が確認された。

[0078] 本実験では、HMGB-1を脳梗塞作製後に血管内に投与することで、脳梗塞巣の縮小効果が認められた。これまで脳梗塞後に本人の骨髄細胞を静脈投与することで、脳梗塞の改善効果があることが知られているが、HMGB-1は骨髄由来多能性幹細胞を動員する活性を有するため骨髄細胞を静脈投与する場合と同様の効果があることが期待される。また、脳梗塞部位に直接HMGB-1を直接投与することは、脳組織の損傷や炎症の惹起などを誘発する可能性があるため、本実験のような血管内投与、皮下投与のような異所性投与は脳梗塞治療を可能にする優れた投与方法である。

実施例 7

[0079] HMGB-1投与による脳梗塞後の生存率改善

8週齢C57/Bl6 雄マウスにイソフルランを用いて吸入麻酔を行った後、頭部皮膚を切開し、頭蓋骨に直接レーザードップラー血流計プローブを接着し脳血流を確認した。さらに胸骨から下顎まで正中皮膚を切開し、右総頸動脈を剥離し4号絹糸を用いて緩く結紮した。右外頸動脈の遠位部に6号絹糸をかけて結紮した。総頸動脈の系に緊張を加えながら右外頸動脈近位部に穴を開けて、先端 $700\mu\text{m}$ を加熱成形した6号モノフィラメントナイロン糸（塞栓糸）を挿入した。内頸動脈に向けて塞栓糸を進め、塞栓糸の先端から約8 mmまで挿

入した部位で総頸動脈系をゆるめた。レーザードップラー血流計によって血流遮断前後で血流計の数値が10分の1になることを確認した。

血流遮断を一定時間（45分間もしくは60分間）それぞれのマウスに行った後で塞栓系を抜去し血流を回復させた。12時間後、精製HMGB1（10 μ g）を500 μ LのPBSに希釈して作製した疾患モデルマウスの尾静脈から投与した。以後4回24時間おきに同様にHMGB-1を投与した。コントロールマウスにはPBSを投与した。梗塞作製後7日間の生存率の観察を行った。

[0080] 結果を図7に示す。梗塞時間30分間のマウスは全例7日後まで生存した（それぞれN=3）（図示さず）。梗塞時間45分間のマウスにおいては、PBS投与例で7日後の生存率が40%であるのに対し、HMGB-1投与例では全てのマウスが生存していた。梗塞時間60分間のマウスにおいては、PBS投与例で7日後の生存率が50%であったのに対しHMGB-1投与例では全てのマウスが生存していた。

[0081] 45分間および60分間の梗塞時間のモデルいずれにおいても、コントロール群（PBS投与群）では7日後までに生存したのは約半数であった。HMGB-1を脳梗塞作製12時間後に投与を開始することにより、梗塞作製7日後までの生存率改善が認められた。脳梗塞は、梗塞の部位、範囲、時間によっては生命予後を左右する疾患である。また、脳梗塞はしばしば麻痺、意識消失などを伴うため医療機関にかかることが遅れることがある。現在効果が認められているt-PA製剤のような医薬品は発症後3時間から4時間以内に投与する必要があるため、全脳梗塞の症例のうち本製剤が適応となる割合は極めて少ない。脳梗塞発症後長時間経過した場合にも投与可能かつ有効な治療薬は現在のところ少ない。本発明は、静脈内投与という極めて簡便かつ低侵襲な方法で、脳梗塞発症後長時間の経過後（12時間後）に投与を開始しても生命予後を改善することが可能であるため、多くの脳梗塞の例に対して投与可能な新しい脳梗塞治療薬の開発を可能にする。

実施例 8

[0082] 骨折治癒過程における骨折部以外の部位の骨髄多能性幹細胞の関与

C57BL/6雄マウス（6週齢）に致死量放射線（10Gy）を照射し、その直後に

尾静脈よりGFP (green fluorescent protein) トランスジェニックマウス由来骨髄細胞 (5×10^6 個/0.1ml 生理的リン酸緩衝溶液pH7.4) を移植した(GFP骨髄キメラマウス)。8週間後、GFP骨髄キメラマウス (図8 左のマウス) と野生型マウス (図8 右のマウス) を皮膚で結合したパラビオーシスを作製した。さらに、野生型マウス (図8 右のマウス) の右下肢に骨折を作製し、骨折治癒後の組織切片を作製した。切片に対し、4%スキムミルク含PBSでブロッキング後、4%スキムミルク含PBSに希釈した抗マウスオステオカルシン抗体を反応させ、PBSで洗浄後、4%スキムミルク含PBSに希釈したPE標識抗ラットIgG抗体と室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、DAPIを用いて核を染色しさらにPBSで洗浄した。封入後共焦点レーザー顕微鏡を利用して蛍光を観察した。

[0083] その結果を図8に示す。オステオカルシン (OC) は赤色蛍光部分であり、骨髄由来細胞であるGFP陽性細胞は緑色蛍光部分である。重ね合わせた像 (Merge) の黄色の細胞がオステオカルシン陽性の骨髄由来細胞である。すなわち、図8より、左側のGFP骨髄キメラマウスの骨髄細胞が野生型マウスの右足の骨折部位に移動し、骨芽細胞に分化したことが示された。

[0084] 従来、骨折の治癒過程では損傷部位近傍の骨芽細胞が損傷部位に集まり治癒促進すると考えられてきた。しかし、本結果から、損傷部位遠方の骨髄由来細胞が骨折部分に移動して損傷組織の修復を行っていることが明らかになった。左のマウスと右のマウスは皮下および皮内の血管によって交通されているため、全身の骨髄から多量の骨髄間葉系幹細胞などの骨髄多能性幹細胞を血中に動員する事が可能になれば、骨折部分の治癒を促進することが可能になると予想される。

実施例 9

[0085] 目的：骨折モデルマウスにおけるHMGB1静脈投与による損傷部位への骨髄間葉系幹細胞の動員活性の評価。

方法：上記の目的に対して以下の方法により研究を行った。

1) 実験ではPDGFレセプター α のプロモーターの下流にGFPタンパクをゲノム

にノックインしたマウス (PDGFR α -GFPマウス) (参考文献: Hamilton et al., Mol Cell Biol. 2003 Jun;23(11):4013-25) を使用した。このマウスはPDGFレセプター α が発現している細胞においてGFPタンパクが発現するため、蛍光顕微鏡を用いて観察すると緑色の蛍光を検出できる。

2) PDGFR α -GFPマウスの骨髓細胞を採取し、細胞培養用皿に播種し10% FBS含有 α -MEMで培養を行った。3-4日ごとに培地を交換し約14日後に付着している細胞を回収した。回収した細胞を抗CD11b MACSビーズを使用してCD11b陽性細胞とCD11b陰性細胞にわけた。蛍光顕微鏡で観察したところCD11b陽性細胞はGFP陰性(図42のA1, A2)であり、CD11b陰性細胞はGFP陽性(図42のB1, B2)であることを確認した。HMGB1がこれらの細胞をマイグレーションさせるかを調べるためにボイデンチャンバー法を行った。ボイデンチャンバーの上層にはそれぞれCD11b陽性細胞またはCD11b陰性細胞を入れ、下層にはHMGB1を0.50・100 μ g/mLになるように10%FBS含有DMEMに希釈して入れた。チャンバーは37°C、5%CO₂のインキュベーター内で静置した。4時間後チャンバーのメンブレンを回収し下層に向かってマイグレーションした細胞を染色することで検出した(図43)。

3) 12週齢雄PDGFR α -GFPマウスをイソフルランにて全身麻酔し、左下腿頸骨の骨折モデルを作成した。骨折作成直後、24時間後、48時間後の計三回10 μ gのHMGB1を500 μ LのPBSに希釈し尾静脈から投与した。陰性コントロールは500 μ LのPBSを尾静脈から投与した(N=6)。

4) 骨折作成72時間後左下腿脛骨を取り出し4%パラホルムアルデヒド含PBSを用いて24時間静置し組織を固定した。PBSで洗浄した後、蛍光実体顕微鏡を用いてGFPの蛍光を検出した(図44)。

[0086] 結果:

CD11b陽性の細胞はGFP陰性でありPDGFレセプター α を発現していないことが示唆された(図42のA1, A2)。CD11b陰性の細胞はGFP陽性でありPDGFレセプター α を発現していることが示唆された(図42のB1, B2)。CD11b陽性 (PDGFレセプター α 陰性) 細胞はHMGB1によってマイグレーションしなかったが、CD11

b陰性（PDGFレセプター α 陽性）細胞はHMGB1によってマイグレーションした（図43）。

陰性コントロールマウスであるPBS投与（図44のD1）群に比較すると、HMGB1投与（図44のD2）群のうち6匹中4匹において、骨折部位周囲の骨にGFP陽性（PDGFレセプター α 陽性）細胞が認められた。

[0087] 考察：本実験では、骨髄間葉系幹細胞を生きたまま観察するために、骨髄間葉系幹細胞のマーカーの一種であるPDGFレセプター α 陽性細胞がGFPを発現するマウス（PDGFR α -GFPマウス）を使用した。骨髄細胞には造血系細胞（赤血球、白血球、マクロファージなど）、間葉系細胞が含まれるが、これらの細胞のうち細胞培養皿に接着する細胞はマクロファージ（CD11b陽性）と骨髄間葉系幹細胞（CD11b陰性）であることが知られている。また、PDGFレセプター α は骨髄間葉系幹細胞のマーカーの一種であることから、本実験で得られたCD11b陰性かつGFP陽性（PDGFレセプター α 陽性）は骨髄間葉系幹細胞と考えられる。ボイデンチャンバー法の結果から、HMGB1はマクロファージ（CD11b陽性細胞）をマイグレーションさせることなく、骨髄間葉系幹細胞（PDGFレセプター α 陽性、CD11b陰性）をマイグレーションさせることが明らかになった。また、PDGFR α -GFPマウスを用いた骨折モデルマウスにおいて、陰性コントロール群に比較して、HMGB1投与群において骨折部分の周囲にGFP陽性細胞（PDGFレセプター α 陽性細胞）が集まっていることが認められた。これらのGFP陽性細胞はHMGB1によって動員された骨髄間葉系幹細胞と考えられる。

[0088] 骨髄間葉系幹細胞は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などに分化する多能性幹細胞であることが知られている。一方、一般に骨折の治癒機構は骨折部位もしくは近傍から骨芽細胞が遊走することで治癒が行われると考えられているが、実施例8におけるパラビオーシスの実験結果が示すように骨折部位以外の骨の骨髄間葉系幹細胞も骨折部分の再生に寄与していることが考えられる。

[0089] 本実験の結果からHMGB1の静脈内投与によって血中内に動員された骨髄間葉系幹細胞が骨折部分に集まってくることが明らかになったことから、HMGB1が

骨折の治療薬として利用できると考えられる。

[0090] CD11b陽性細胞（PDGFレセプター α 陰性）であるマクロファージは炎症系の細胞であるため、マクロファージをマイグレーションしないことは過度の炎症を防ぐことにつながる。過度の炎症は組織損傷の拡大や治癒期間が延びるため組織再生においては不利となる。この結果から、HMGB1は、組織再生に有効な間葉系幹細胞特異的にマイグレーション活性を有することが示された。

[0091] 従来の骨折の治療は非観血的整復や手術、ギブス固定などが主であり、骨折部位の積極的な治癒促進のため薬剤はほとんど存在しない。本方法は薬剤の静脈投与によって行われるため、難治性の骨折、手術困難な骨折などにも応用可能であり、これまでにない画期的な治療方法を提供する。

[0092] [参考例1]

目的：生体移植皮膚組織の機能的再生時における骨髓由来細胞寄与の評価

方法：上記の目的に対して以下の方法により研究を行った。

1) GFP骨髓移植マウスに対する生体皮膚移植系を利用して、移植皮膚片の機能的再生時の骨髓由来細胞寄与程度を検討した。具体的には、C57BL/6雄マウス（6～8週齢）に致死量放射線（10Gy）を照射し、その直後に尾静脈よりGFP（green fluorescent protein）トランスジェニックマウス由来骨髓細胞（ 5×10^6 個/0.1ml 生理的リン酸緩衝溶液pH7.4）を移植した。

2) 移植骨髓細胞の生着を待って（6週間）得られたGFP骨髓移植マウスの背部皮膚に、新生マウス皮膚（雌）を移植した。

3) 移植皮膚片の生着と十分な皮膚組織再生を待って（4週間）、移植皮膚片領域におけるGFP蛍光の集積程度を、蛍光実体顕微鏡を利用して観察した。

4) 吸入麻酔下に移植皮膚片を生検により採取し、冷却装置付ミクロトームを用いて皮膚凍結切片（ $6 \mu\text{m}$ ）を作製、4%パラホルムアルデヒド固定（30分間）、組織内細胞核をDAPIで染色、表皮細胞特異的ケラチン5の抗体を用いて免疫染色を施行した後、組織を封入して共焦点レーザー顕微鏡によりGFP陽性骨髓由来細胞の存在を検討した。また一部の標本はHE染色によりその組織構築を検討した。

結果：GFP骨髓移植マウスへの生体皮膚移植系において、再生した皮膚領域に一致した強いGFP蛍光の集積が観察された（図9）。また、移植皮膚片のHE標本を用いた組織学的観察では、多数の毛包を含む皮膚組織の機能的再生が確認された（図9）。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、ケラチン5を発現している表皮角化細胞、真皮線維芽細胞、さらには平滑筋細胞や脂肪細胞の多くがGFP蛍光を示し、これらの細胞が骨髓由来であることが示された（図10）。即ち、移植皮膚の機能的再生時に必要な上皮系および間葉系細胞の多くが、骨髓由来幹細胞により供給されていることが初めて明らかとなった。

考察：これらの研究結果は、これまで臨床現場で日常的に行われている皮膚移植における皮膚再生時に、骨髓由来細胞が大きく寄与していることを初めて明確に示したものであり、極めて画期的な発見である。

[0093] 骨髓内には造血系幹細胞と間葉系幹細胞の二つの幹細胞システムが存在することが報告されている。今回の研究で示された、移植皮膚内に大量動員された骨髓由来上皮系細胞および間葉系細胞が骨髓由来造血系幹細胞から供給されていると予想するのは困難であり、移植組織の機能的再生には骨髓由来間葉系幹細胞が寄与している可能性が強く示唆される。即ち、植皮直後に疎血・壊死方向にある移植皮膚組織から骨髓由来間葉系幹細胞動員因子が放出され、骨髓から間葉系幹細胞を、末梢血液循環を介して移植皮膚片内に動員し、機能的皮膚組織再生を誘導していることが予想された。

[0094] [参考例2]

目的：皮膚組織抽出液内に存在する骨髓間葉系幹細胞誘導因子の同定

方法：疎血状態にある切除皮膚からの放出が予想される骨髓間葉系幹細胞動員因子の同定を目的として、以下の方法により研究を進めた。

1) マウス骨髓由来間葉系幹細胞を得るために、C57BL/6マウスの骨髓細胞を大腿骨もしくは下腿の骨から採取し、10%胎仔ウシ血清含D-MEM(Nacalai 社製)を細胞培養培地として細胞培養皿に撒き、37℃、炭酸ガス濃度5%の条件下で培養した。細胞が占める面積が培養皿底面積に対して70から100%に増殖した時点で、0.25%トリプシン1mMEDTA（Nacalai社製）を用いて細胞を培養

皿からはがし、さらに同じ条件で継代培養した。継代作業は少なくとも5回以上繰り返した。さらにこれらの付着細胞を単離培養しフローサイトメトリーによる細胞表面抗原の分析を行いLin陰性、CD45陰性、CD44陽性、Sca-1陽性、c-kit陰性であることを確認した。これらの細胞は骨細胞、脂肪細胞に分化可能で骨髄間葉系幹細胞の性質を有することを確認した。

2) 新生マウス400匹から得た遊離皮膚片を生理的リン酸緩衝液pH7.4 (PBS) 400ml内に浸し、4°Cで24時間インキュベーションした後、組織を取り除くために、4°Cの条件下で10分間、440Gで遠心し上清を回収して皮膚抽出液を作製した。

3) 得られた皮膚抽出液の中に骨髄間葉系幹細胞誘導活性が存在することを確認するため、ボイデン・チャンバーを用い、本発明者らが既に株化しているC57BL6マウス骨髄由来間葉系幹細胞に対する遊走活性を検討した。具体的にはボイデン・チャンバーの下槽（容量25 μ l）に皮膚抽出液（25 μ l）を挿入し、8 μ mの微細穴を持つポリカーボネートメンブレンを乗せ、さらにこれに接してボイデン・チャンバー上槽（容量50 μ l）を載せて、その中に骨髄由来間葉系幹細胞浮遊液（ 5×10^4 個/50ml培養液：DMEM/10%ウシ胎仔血清）を入れ、CO₂インキュベーター内で37°C、4～24時間培養した。培養後、チャンバーの上槽をはずし、シリコン薄膜を取り出して、その微細穴を通過してチャンバー下槽に遊走した骨髄由来間葉系幹細胞の数を染色により定量的に検討した。

4) 皮膚抽出液内の骨髄由来間葉幹細胞動員活性をもつ因子を精製するために、ヘパリンアフィニティーカラム・クロマトグラフィー、および陰イオン交換カラム（Qカラム）クロマトグラフィーを施行した。皮膚抽出液を4°Cの9倍容20 mM リン酸バッファー pH 7.5を用い 10倍に希釈した（希釈液A）。あらかじめ、20 mM リン酸バッファー pH 7.5（30ml）をHiTrap Hepalin HP column（カラム容量：5ml、GE Healthcare）の中に流しカラムを平衡化した。さらに、希釈液Aをカラムに結合させた。その後20 mM リン酸バッファー pH 7.5, 100mM NaCl（30ml）でカラムを洗浄した。吸着したタンパクを溶出する

ため20 mM リン酸バッファー pH 7.5, 1000mM NaClをカラム内に流入し、溶出液をチューブに分画した。吸着画分をそれぞれ、2) で説明したボイデン・チャンバーを利用した遊走活性評価法により遊走能を有する画分を集めた。これを9倍容50 mM Tris HCl pH 8.0で希釈した(希釈液B)。あらかじめ、50 mM Tris HCl pH 8.0(30ml) をHiTrap mono Q column (カラム容量: 1ml、GE Healthcare) の中に流しカラムを平衡化した。さらに、希釈液Bをカラムに結合させた。吸着したタンパクを溶出するためTris HCl pH 8.0, 1000mM NaClをカラム内に流入し、溶出液をチューブに分画した。以上の精製過程はすべて4~16℃で行うことが可能であるが、4~8℃で行うことが好ましく、4℃で行うことが更に好ましい。この溶出液を2) で説明したボイデン・チャンバーを利用した遊走活性評価方法により評価した。

- [0095] 5) ボイデン・チャンバーによる遊走活性評価およびカラム・クロマトグラフィーの組み合わせを利用して得られた骨髓由来間葉系幹細胞動員活性を持つ皮膚抽出液由来精製標品を、SDS-PAGE電気泳動法により分子量を基にしてゲル内分画し、銀染色により泳動蛋白のバンドを検出した。
- 6) 5) のSDS-PAGE電気泳動および銀染色により単一バンドとしてゲル内分画された皮膚抽出液由来蛋白群の中で、骨髓由来間葉系幹細胞動員活性の最も強いクロマトグラフィー精製標品から得られた蛋白バンドをすべて切り出して、質量分析およびデータベース解析により当該蛋白の同定を進めた。
- 7) 同定した蛋白群の中から骨髓由来間葉系幹細胞動員活性を持つ候補蛋白を選定し、その候補蛋白を含む精製標品を中和抗体で処理(精製標品溶液100 μ lを当該蛋白のポリクロナール抗体100倍希釈条件にて氷上で30分間インキュベート)した後、骨髓由来間葉系幹細胞動員活性の阻害程度を、ボイデン・チャンバーを用いた遊走能アッセイにて検討した。
- 8) 得られた骨髓由来間葉系幹細胞精製標品をマトリゲルの中に約10%ボリュームとなるように混入し、直径約1mm、5mm長のシリコンチューブ内に挿入し、これをGFP骨髓移植マウス背部皮下に移植した。2週間後に挿入チューブを取り出して、チューブ内に遊走した骨髓由来細胞から出るGFP蛍光を蛍光測

定装置により定量的に解析した。さらに、チューブ内から遊走細胞を取り出し、DMEM/10%ウシ胎仔血清培地に播種してCO₂インキュベーター内で培養することにより、骨髓由来間葉系幹細胞の生体内動員活性を検討した。2週間継続して培養した細胞は2%パラホルムアルデヒドで25℃の条件下で、10分間固定した後、5分間ずつ4回PBSを用いてパラホルムアルデヒドを洗浄し、2%スキムミルク液で処理をし、0.5% tween20含有2%スキムミルクで1000倍に希釈した抗マウスケラチン5抗体を4℃の条件下で16時間反応させた。5分間ずつ4回PBSを用いて抗体を洗浄し、2%スキムミルクで1000倍に希釈したAlexa546標識抗ウサギIgG抗体を25℃の条件下で1時間反応させた。

[0096] 結果：切除した新生マウス皮膚からPBS中に抽出した溶液をスタート材料として、上述した方法により骨髓由来間葉系幹細胞動員活性を持つ蛋白質の同定と機能解析を進めた。ボイデン・チャンバーによる遊走活性解析により、皮膚抽出液中に極めて強い骨髓由来間葉系幹細胞誘導活性があることが示された（図11）。この活性を指標にしてヘパリンアフィニティーカラムおよび陰イオン交換カラム（Qカラム）を用いて目的因子の精製を進め、得られた各分画をSDS-PAGE電気泳動にて解析した結果、銀染色により単一バンドとしてゲル内分画された数個の蛋白を含む精製標品内に強い骨髓由来間葉系幹細胞動員活性があることが示された（図12レーン7）。得られた銀染色バンドを切り出して、質量分析、データベース解析を進めた結果、矢印で示す分子量約25,000の蛋白がHMGB1であることが明らかとなった（図12）。この精製分画（レーン7）中に含まれるHMGB1が目的の骨髓由来間葉系幹細胞動員活性を持つことを明らかにする目的で、抗HMGB1ポリクローナル抗体による遊走阻害実験を行った。その結果、抗HMGB1ポリクローナル抗体が当該精製標品中の骨髓由来間葉系幹細胞遊走活性を強く阻害することが明らかとなり（図13）、皮膚抽出液内に存在する骨髓由来幹細胞動員因子がHMGB1であることが明らかとなった。

さらに、HMGB1が生体内で骨髓由来間葉系幹細胞動員活性を持つことを確認する目的で、この精製標品を入れたシリコンチューブをGFP骨髓移植マウス背

部皮下に挿入し、2週間後にチューブ内に動員された細胞の性質を検討した。その結果、対照コントロール（図12におけるSDS-PAGEレーン4に用いた精製標品）に比較して、HMGB1精製標品はGFP陽性の骨髄由来細胞をチューブ内に多数（対照コントロールの約3倍）動員していた（図14）。図15に蛍光実体顕微鏡による強拡大像を示す。さらに、チューブ内に動員されたGFP陽性細胞を取り出し、DMEM/10%ウシ胎仔血清培地内で培養した結果、培養開始直後は円形の浮遊細胞状態であったが（図16）、24時間後にはGFP陽性骨髄由来細胞は培養シャーレに付着し、紡錘系の線維芽細胞様形態、さらには類円形の上皮細胞様形態の細胞として増殖することが確認された（図17）。さらにこれらの細胞を2週間継続して培養するとGFP陽性骨髄由来細胞の中に毛包の形態を呈する細胞を確認した（図18A；明視野、弱拡大、図18B；GFP蛍光、弱拡大、図18C明視野、強拡大、図18D；GFP蛍光、強拡大）。また、上皮ケラチノサイトのマーカーであるケラチン5に対する免疫組織化学を行ったところ、GFP陽性骨髄由来細胞の中にケラチン5陽性細胞を確認した（図18E；明視野、図18F；ケラチン5陽性細胞の蛍光）。

[0097] 考察：今回本発明者らは、世界で初めて、遊離皮膚片がHMGB1を産生すること、産生されたHMGB1は骨髄由来間葉系幹細胞を皮膚片内に大量に動員する活性を持つこと、皮膚片内に動員された骨髄由来間葉系幹細胞は皮膚組織内で線維芽細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞などの間葉系細胞に分化し、さらには表皮細胞毛包を形成する細胞に分化することにより、移植皮膚組織の機能的再生を誘導していることを見出した。このHMGB1による骨髄由来間葉系幹細胞動員およびその結果としての機能的組織再生は、移植皮膚再生のみならず、疎血・壊死を伴う多くの臓器・組織損傷時に機能的組織再生誘導機序として機能していることが容易に予想される。HMGB1製剤による医薬品を開発することにより、損傷組織再生時に骨髄由来間葉系幹細胞を局所に動員することが可能になれば、線維性瘢痕治療により機能不全に陥ることの無い、必要な機能的器官の伴う機能的組織再生誘導医療が可能になると確信する。

[0098] [参考例3]

目的：皮膚抽出液中HMGB1ファミリーの同定と骨髓間葉系幹細胞誘導活性の検討

方法：新生マウス皮膚抽出液中に含まれるHMGB蛋白ファミリーの有無をWestern blot 法を用いて確認した。サンプルとして〔参考例2〕で得られた皮膚抽出液を10 μ l をSDS-PAGE法を用いて電気泳動し、ゲル中で分離した蛋白をブロッティング装置（ATTO）を用いPVDF膜にトランスファーした。3%スキムミルク0.1% Tween 20 含PBS（S-T-PBS）にて、室温で1時間インキュベートした後、S-T-PBSで1000倍に希釈したラビット抗マウスHMGB1 抗体、ラビット抗マウスHMGB2抗体、ラビット抗マウスHMGB3抗体をそれぞれ4℃で16時間反応させた。反応後、同PVDF膜をS-T-PBSにて5分間5回洗浄後、S-T-PBSで2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラビットIgG抗体（GE Healthcare）にて同PVDF膜を25℃で1時間インキュベートした。さらにS-T-PBSにて5分間5回洗浄後ECL Western Blotting Detection System（GE Healthcare）を同PVDF膜と反応させ、ECL film を感光させた後現像してHMGB1、HMGB2、HMGB3タンパクの存在を検出した。

[0099] 新生マウス皮膚からTrizol（Invitrogen）を用いてRNA を抽出し更にSuper Script III cDNA synthesis kit（Invitrogen）を用いてcDNA を合成した。このcDNA をテンプレートとしてHMGB1、HMGB2、及びHMGB3 のcDNAをPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を用いて増幅し、アミノ酸配列のN末端にFlag tagの配列（Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys；配列番号：30）を付加したタンパクを発現するように、哺乳類細胞でタンパクを発現させるプラスミドベクターpCAGGSに挿入した。これらのプラスミドベクターをHEK293（ヒト胎児腎細胞由来培養細胞株）に遺伝子導入し48時間培養しタンパクを発現させた。HMGB1、HMGB2、及びHMGB3タンパクをそれぞれ発現させた細胞及び培養上清は4℃で16時間インキュベートした後、4400g・5分間遠心し上清を回収した。この上清50mL あたり100 μ LのAnti Flag 抗体Gel（Sigma）を混合し4℃で16時間インキュベートした。遠心しGelを回収した後PBSを用いて、5回洗浄した。更に3X Flag peptide（final 100 μ g/ml）を用いて溶出した。リコンビナン

トタンパクの発現をS-T-PBS で1000倍希釈したマウス抗Flag 抗体、及びS-T-PBS で2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (GE Healthcare) を用いたWestern blot 法にて確認した。これらの精製リコンビナントタンパクのマウス骨髓間葉系幹細胞の遊走活性を〔参考例2〕と同様にボイデン・チャンバーを用いて評価した。また、HMGBファミリーのin vivoでの薬効を観察するために、8週齢C57BL/6マウスの背部皮膚を直径8 μ mの円形に切除し皮膚潰瘍モデルを作製し、そこに精製したHMGB1・HMGB2・HMGB3それぞれ (100 ng) を、1g/100mL PBSの濃度のヒアルロン酸溶液と等量ずつ混合しそのうち100 μ Lを潰瘍面に投与した。潰瘍面は乾燥しないように、粘着性透明創傷被覆・保護材Tegaderm (スリーエムヘルスケア)で覆い、経時的に創傷面積を計測し治癒効果を測定した。

[0100] さらにヒト骨髓間葉系幹細胞をヒト皮膚抽出液およびヒト精製HMGB1が遊走する活性があるかを調べるために、〔参考例2〕と同様にボイデン・チャンバーを用いて評価した。面積1 cm²のヒト皮膚を1 mlのPBSに浸し、4℃の条件下で16時間インキュベーションした後、4℃の条件下で10分間440Gで遠心した。上清のみを回収し、ヒト皮膚抽出液として使用した。また、ボイデン・チャンバーの上部に入れる細胞はヒト骨髓間葉系幹細胞 (Cambrex社)を用いた (本細胞はフローサイトメトリーによる細胞表面抗原の分析の結果、CD105陽性、CD166陽性、CD29陽性、CD44陽性、CD34陰性、CD45陰性とされている。さらに分化誘導試験によって脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化が陽性である)。また、チャンバー下部には、ヒトHMGB1を100ng /well (R & D社) 及びPBSにて10倍希釈したヒト皮膚抽出液を入れ、コントロールとしてPBSを用いた。

[0101] 結果: Western blot の結果、HMGB1のバンドの他にHMGB2やHMGB3のバンドが検出された。よって新生マウス皮膚抽出液の中には、HMGB1の他にファミリータンパクであるHMGB2およびHMGB3が含有されていることが確認された (図19)。それぞれのタンパクのN末端にFlag tagを付加したHMGB1・HMGB2・HMGB3の発現ベクターを作製した (図20)。HEK293細胞に発現ベクターを遺伝子導入し、発現したタンパクをFlag tag を用いて精製した後、Western blot

法を用いてタンパクを確認した（図21）。これらの精製タンパクを用いたマウス骨髄間葉系幹細胞の遊走活性を測定したところ、いずれのタンパクにおいても活性が確認された（図22）。マウスの背部に作製した潰瘍面積を7日毎に計測したところ、非治療群に比べHMGB1,2および3による治療群の方が有意に潰瘍面積の縮小効果を確認できた（図23）。マウスの場合と同様に、ヒトHMGB1及びヒト皮膚抽出液はヒト骨髄間葉系幹細胞を遊走する活性があることが明らかとなった（図24）。

[0102] 考察：HMGB1 と相同性が高いタンパクとしてHMGB2及びHMGB3が知られている。これらのタンパクもHMGB1と同様の性質を有することが期待される。そこで、遊離皮膚片抽出液からHMGB1のファミリーであるHMGB2およびHMGB3も産生されることを確認した。さらに HMGB1・HMGB2・HMGB3のリコンビナントタンパクを作製し、*in vitro* での骨髄間葉系幹細胞遊走活性を確認し、*in vivo* における皮膚潰瘍治療効果も確認した。新生マウス遊離皮膚片中のHMGBファミリー（HMGB1・HMGB2・HMGB3）およびリコンビナントHMGBファミリーには骨髄間葉系幹細胞誘導活性や骨髄由来の上皮系に分化可能な幹細胞を局所に誘導する活性があり、さらにこれらの誘導された骨髄由来の細胞群が損傷組織において表皮ケラチノサイトや毛包や線維芽細胞のようなさまざまな細胞に分化して損傷組織の治癒を促進する効果があることが明らかになった。また骨髄間葉系幹細胞は多能性幹細胞であるので、他の組織損傷状態、例えば、脳損傷、心筋梗塞、骨折などの組織損傷の治療にHMGBファミリーを全身投与もしくは局所投与することで同様に治療効果が期待できると確信する。

[0103] また、ヒトとマウスのHMGB1はそれぞれを構成するアミノ酸配列で98%（213/215）の相同性があり、HMGB2はそれぞれを構成するアミノ酸配列で96%（202/210）の相同性があり、HMGB3はそれぞれを構成するアミノ酸配列で97%（195/200）の相同性があることがわかっている。そこで、ヒトのHMGBがマウスのHMGBと同様の活性を有することが考えられるが、本参考例の結果から、ヒトの皮膚抽出液やHMGB1がマウスの皮膚抽出液や、HMGB1と同様に骨髄間葉系幹細胞を誘導する活性があることが明らかになった。

[0104] 〔参考例4〕

目的：骨髄間葉系幹細胞誘導因子組織抽出液の作製方法の確立

方法：6週齢C57BL6一匹分の脳、心臓、腸、腎臓、肝臓及び新生マウス皮膚一匹分を生理的リン酸緩衝液pH7.4 (PBS) 1ml 内に浸し、4°Cで24時間インキュベーションした後、組織を取り除くために、4°Cの条件下で10分間、440Gで遠心し上清を回収して組織抽出液とした。得られた抽出液の中に骨髄間葉系幹細胞誘導活性が存在することを確認するため、ボイデン・チャンバーを用い、〔参考例2〕と同様に骨髄由来間葉系幹細胞に対する遊走活性を検討した。また、同じサンプル中に含まれるHMGB1の濃度をHMGB1 ELISA kit(シノテスト)を用いて計測した。更に脳、心臓および皮膚の組織抽出液を〔参考例2〕と同様に、ヘパリンアフィニティーカラムに結合させ、結合画分のタンパクの骨髄間葉系幹細胞誘導活性をボイデン・チャンバーを用いて確認した。

[0105] 結果：マウス脳抽出液には新生マウス皮膚抽出液と同等のHMGB1が含有されていた。さらに、骨髄間葉系幹細胞の誘導活性はマウス脳でも皮膚と同様に認められた。マウス腸抽出液とマウス心臓抽出液中にHMGB1はほとんど含まれなかったが、骨髄間葉系幹細胞の誘導活性は認められた。また、マウス脳、マウス心臓のヘパリンカラム結合画分はマウス皮膚のヘパリンカラム結合画分と同様に骨髄間葉系幹細胞を誘導する活性があった（図25）。表1は、マウス各組織抽出液のHMGB1濃度と骨髄間葉系幹細胞の誘導活性を測定した結果を示す。

[0106]

[表1]

	HMGB1濃度 (ng/ mL)	骨髄間葉系幹細胞誘導活性
皮膚	110	あり
脳	140	あり
心臓	4	あり
腸	0	あり
腎臓	115	ND
肝臓	61	ND

ND:施行せず

[0107] 考察：皮膚のみならず脳でも臓器を生理的緩衝液に浸すだけという簡便な方法でHMGB1を簡便に抽出する方法を開発した。この方法は、他の臓器例えば、肝臓や腎臓でも同様である。また心臓や腸からの抽出液にはHMGB1をほとんど含有しないにもかかわらず骨髄間葉系幹細胞誘導活性を認めた。このことは抽出液中にHMGB1と異なる、他の骨髄間葉系幹細胞誘導物質が含まれていることが考えられる。これらの抽出液に含まれる物質は、もともとそれぞれの組織に存在するものであり、生理的には組織損傷時に骨髄間葉系幹細胞を損傷組織に誘導していると考えられる。本発明によってHMGB1を含む複数の骨髄間葉系幹細胞誘導物質を各種臓器から機能的にかつ簡便に抽出する新規の方法を開発できた。さらに、組織抽出液から骨髄間葉系幹細胞誘導物質を精製するためにヘパリンカラムに結合させる方法を開発した。また、これらの骨髄間葉系幹細胞誘導活性を有する成分は皮膚と同様の方法で脳や心臓からもヘパリンカラムを用いて精製することが可能である。

[0108] [参考例5]

目的：培養細胞から間葉系幹細胞遊走活性物質を抽出する方法を確立する。

方法：ヒト胎児腎由来培養細胞株HEK293及びヒト子宮頸癌細胞株HeLaはそれぞれ10%胎仔牛血清含D-MEM(nacalai 社製)で培養した。それぞれの細胞を

PBSで洗浄後、細胞 1×10^7 個を 4°C の 5ml の PBS (nacalai 社製) に 16 時間浸した。重力加速度 $4.4 \times 10^6 \text{g}$ で 4°C で 5 分間遠心し上清を回収した。ボイデン・チャンバーの上層にヒト骨髄間葉系幹細胞をいれ、下層に DMEM で 5 倍希釈した細胞抽出液をいれ、ヒト骨髄間葉系幹細胞遊走活性を確認した。

結果：HEK293 抽出液も HeLa 抽出液も同様に骨髄間葉系幹細胞を遊走する活性を示した（図 26）。

考察：培養細胞を PBS に浸すという簡便な方法で骨髄間葉系幹細胞を遊走する活性物質を抽出することに成功した。

[0109] [参考例6]

目的：マウス脳欠損モデルを作成し、局所損傷部位に皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分を徐放化して投与することで、自己の骨髄系に含まれる幹細胞を局所損傷部位に遊走させ、神経系細胞の再生を誘導できないか検討する。

方法：

(1) 皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分の作製

切除した新生マウス皮膚から PBS（一匹/ml）中に 4°C で 16 時間インキュベーションし抽出した皮膚抽出液を 4°C の 9 倍容 20 mM リン酸バッファー pH 7.5 を用い 10 倍に希釈した。あらかじめ、20 mM リン酸バッファー pH 7.5（30ml）を HiTrap Hepalin HP column（カラム容量：5ml、GE Healthcare）の中に流しカラムを平衡化した。さらに、希釈液をカラムに結合させた。その後 20 mM リン酸バッファー pH 7.5, 100mM NaCl（30ml）でカラムを洗浄した。吸着したタンパクを溶出するため 20 mM リン酸バッファー pH 7.5, 1000mM NaCl をカラム内に流入し、溶出液をチューブに分画した。吸着画分をそれぞれ、マウス骨髄由来細胞株の遊走活性を上記に示したボイデン・チャンバー法を用いて評価し遊走能を有する画分を集めた。この活性を有する溶液を皮膚抽出液ヘパリン精製画分として以下の実験に使用した。

[0110] (2) 骨髄抑制マウスの作成

マウスに 10Gy の X 線単回照射を行い、骨髄抑制マウスを作成した。

[0111] (3) 骨髄抑制マウスへの GFP マウス骨髄移植

GFPマウスの両側大腿骨および下腿骨より骨髓細胞を採取した。これを照射後24時間経過した骨髓抑制マウスの尾静脈より投与した。なお、投与はイソフルランによる吸入麻酔下に施行した。

[0112] (4) マウス脳損傷（脳組織欠損）モデルの作成

GFPマウスの骨髓細胞を移植した骨髓抑制マウスにイソフルランにて吸入麻酔を行い、ペントバルビタール（45mg/kg）を腹腔内に注入した。マウスを脳定位固定装置に固定し、メスにて頭部に正中切開を加えた。ブレグマから右外側2.5mm、前方1mmにドリルを用いて穿頭を施した（図27A）。この部位から深さ3mmの位置を先端にして、20Gサーフロー針の外筒を挿入して固定した。ここでシリンジを用いて、陰圧をかけ、脳組織を一部吸引した（図27B）。

[0113] (5) 皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分の脳組織欠損部への投与

前述の位置に、ハミルトンシリンジと26Gシリンジを用いて、フィブリン糊製剤のフィブリノゲン（ボルヒール（化血研））に溶解した皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分を5 μ l注入し、次にフィブリン糊製剤のトロンビン（ボルヒール（化血研））を5 μ l注入した（図27C）。この操作によって、皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分の徐放剤としての効果を狙った。

[0114] (6) 脳組織欠損部における神経系細胞再生効果の評価

コントロール群と治療群のマウスとを用いて評価した。適切な経過設定を決め（経時的に）、マウスを4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、脳の切り出しを行った。さらに、4%パラホルムアルデヒドを外固定した。15%と30%の勾配をつけたショ糖にて脱水後、凍結切片を作成した。

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) solutionにて核染色を行い、退光防止剤を用いて封入した。共焦点レーザー顕微鏡にて損傷部位（脳組織欠損部）でのGFP陽性細胞の集積を評価した。

結果：投与後、2週間および6週間後のGFP陽性細胞集積を定性的に示す。2週間後（コントロール；図27D、皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分；図27E）および6週間後（コントロール；図27F、皮膚抽出液ヘパリンカラム精製画分；図27G）ともに、コントロール群に比して治療群の損傷部位にGFP陽

性細胞の集積が高い傾向にあった。

考察：皮膚抽出液へパリンカラム精製画分投与により、骨髓由来細胞が脳組織欠損部位に集積し神経細胞の形態を示した。骨髓由来間葉系幹細胞は神経細胞にも分化することが知れており、本結果から、皮膚抽出液へパリンカラム精製画分によって脳損傷部位における神経系細胞再生の誘導できることが明らかになった。また、これは、脳虚血性疾患や脳挫傷における脳組織障害部位での神経再生にも応用可能である。

[0115] [参考例 7]

目的：皮膚組織抽出液内に存在する骨髓由来組織幹細胞誘導因子による骨髓組織幹細胞の末梢血への動員

方法：上記の目的に対して以下の方法により研究を行った。

1) 骨髓由来組織幹細胞誘導剤の調製：新生マウス(2日齢)25匹から得た遊離皮膚片を生理的リン酸緩衝液pH 7.4 (PBS) 25 mlに浸し、4℃で24時間インキュベーションした後、組織を取り除くために、4℃の条件下で10分間、440 Gで遠心し上清を回収して皮膚抽出液 (SE) を作製した。

また、C57/Bl6新生マウス皮膚からTrizol (invitrogen) を用いてRNA を抽出し更にSuperScript III cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いてcDNA を合成した。このcDNA をテンプレートとしてHMGB1のcDNAをPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いて増幅し、アミノ酸配列のN末端にFlag tagの配列 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys ; 配列番号 : 30) を付加したタンパク質を発現するように、哺乳類細胞でタンパク質を発現させるプラスミドベクターpCAGGSに挿入した (図20)。これらのプラスミドベクターをHEK293 (ヒト胎児腎細胞由来培養細胞株) に遺伝子導入し48時間培養しタンパク質を発現させた。HMGB1タンパク質をそれぞれ発現させた細胞及び培養上清は4℃で16時間インキュベートした後、4400 g・5分間遠心し上清を回収した。この上清50 mL あたり100 μ LのAnti Flag 抗体Gel (Sigma) を混合し4℃で16時間インキュベートした。遠心しGelを回収した後PBSを用いて、5回洗浄した。更に 3X Flag peptide (final 100 μ g/ml) を用いて溶出した。溶出したタンパク質は

HMGB1 ELISA kit (シノテスト)を用いて濃度を確認し、凍結乾燥後PBSを用いて200 μ g/mLに調整した。

- [0116] 2) 8週齢雄マウス (C57/Bl6) の尾静脈から前述の皮膚抽出液 (SE) 500 μ L もしくは陰性コントロール群としてPBS500 μ Lを30G1/2の注射針を装着したシリンジを用いて投与した (図28)。投与6/12/24/48時間後、イソフルランによる吸入麻酔下、マウスの心臓からヘパリンコートした1 mLのシリンジを用いて末梢血1 mLを採血し、3 mLのPBSと混合した後、3 mLのFicol (GE healthcare) の上に静かに重層した。遠心機を用い、25°Cで400 g、40分間遠心した。中間層の白濁した層の細胞を単核球画分として回収した。回収した細胞に1 mLの溶血剤であるHLB solution (免疫生物研究所) を加え室温で5分インキュベートした。この溶血操作を2回繰り返した。10 mLのPBSを加え、25°Cで400 g、5分間遠心し上清を除去して細胞を回収した。この細胞1,000,000個に抗マウスPE標識PDGFR α 抗体 (e-Bioscience)、PE標識抗マウスPDGFR β 抗体 (e-Bioscience)、PerCy5標識抗マウスCD44抗体 (BD biosciences) それぞれをPBSで100倍希釈し20分間室温でインキュベートした。その後この細胞を25°C、440 g、5分間遠心し上清を除去した。1%パラホルムアルデヒド含PBSを400 μ L加え、フローサイトメトリー解析のサンプルとした。

8週齢雄マウス (C57/Bl6) の尾静脈からマウスHMGB1を250 μ L (1 μ g/ μ L) もしくは陰性コントロール群としてPBS250 μ Lを30G1/2の注射針を装着したシリンジを用いて投与した (図29)。投与12時間後、イソフルランによる吸入麻酔下、マウスの心臓からヘパリンコートした1 mLのシリンジを用いて末梢血1 mLを採血し、3 mLのPBSと混合した後、3 mLのFicol (GE healthcare) の上に静かに重層した。遠心機を用い、25°Cで400 g、40分間遠心した。中間層の白濁した層の細胞を単核球画分として回収した。回収した細胞に1 mLの溶血剤であるHLB solution (免疫生物研究所) を加え室温で5分インキュベートした。この溶血操作を2回繰り返した。10 mLのPBSを加え、25°Cで440 g、5分間遠心し上清を除去して細胞を回収した。この細胞1,000,000個に抗マウスPE標識PDGFR α 抗体 (e-Bioscience)、PerCy5標識抗マウスCD44抗体 (BD biosc

iences) それぞれをPBSで100倍希釈し20分間室温でインキュベートした。その後この細胞を25℃、440 g、5分間遠心し上清を除去した。1%パラホルムアルデヒド含PBSを400 μ L加え、フローサイトメトリー解析のサンプルとした。

[0117] 結果：皮膚抽出液 (SE) を注射12時間後の末梢血において、有意にPDGFR α 陽性、CD44陽性細胞が動員されていることが確認された (図30)。HMGB1を注射12時間後の末梢血において、有意にPDGFR α 陽性、CD44陽性細胞が動員されていることが確認された (図31)。

[0118] [参考例8]

目的：組み換えHMGB1蛋白の静脈内投与によって、間葉系幹細胞が末梢血中へ動員されるかを確認した。

方法：C57BL6マウス (8~10週齢、オス) 尾静脈より組み換えHMGB1蛋白/生理食塩水 (100 μ g/ml) を400 μ l (40 μ g HMGB1)あるいは生理食塩水400 μ l投与した。12時間後にマウス末梢血を採取してPBSを加え全量を4mLに希釈した。遠心管にFicoll-Paque Plus (GE) 液を3mL 挿入後その上に希釈血液を重層した。400G (18℃) で40分間遠心し、単核球を含む中間層を新しい遠心管に回収し、45 mL のPBSを加え800G (18℃) 5分で遠心し上清を除去した。さらにもう一度45 mL のPBSを加え800G (18℃) 5分で遠心し上清を除去した。得られた単核球をPhycoerythrobilin (PE) 標識抗マウスPDGFR α 抗体およびFluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスCD44抗体で反応させた後、フローサイトメトリー (FacsScan ; Becton, Dickinson and Company) により単核球分画内のPDGFR α 陽性/CD44陽性細胞の存在頻度を評価した。

[0119] 結果：HMGB1投与12時間後に、末梢血単核球分画内のPDGFR α 陽性かつCD44陽性細胞およびPDGFR α 陽性かつCD44陰性細胞が有意に増加していることが明らかとなった (図32)。即ち、HMGB1は骨髓内から末梢血中に、間葉系幹細胞のマーカーとして知られているPDGFR α 陽性細胞を動員する活性があることが示された。

[0120] 考察：PDGFR α およびCD44は骨髓由来の多能性幹細胞を代表する骨髓間葉系幹

細胞の表面マーカーとして知られている。骨髓間葉系幹細胞は骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化可能な多能性幹細胞であり、さらに神経細胞や上皮細胞などにも分化可能とされている。また、本実験で使用した皮膚片は、阻血状態であるため、徐々に組織が壊死状態となり、細胞の表面のタンパク質から核などの細胞内のタンパク質が周囲に放出される。また、HMGB1は皮膚抽出液に含有されるタンパク質である。植皮などではこれらのタンパク質が、シグナルとなって植皮片に骨髓由来の組織幹細胞を動員し、植皮片内で骨髓細胞由来表皮、皮下組織、毛包組織などを再構築し、機能的皮膚を再生していると考えられる。本実験は、このような皮膚抽出液もしくはHMGB1を静脈内に投与することで、末梢循環中に骨髓由来組織幹細胞を動員することに成功した初めての発見である。本発見によって、骨髓由来多能性幹細胞を末梢血中に動員し、脳梗塞や心筋梗塞、骨折、皮膚潰瘍、などの組織損傷を伴う難治性疾患に対する新規治療法が可能になる。また、末梢血中に動員した細胞は通常の採血と同様に採取が可能であり、これまで脳梗塞治療のために骨髓から採取してきた従来の方法にくらべ、簡便で安全な骨髓由来組織幹細胞の採取方法が可能になった。

[0121] [参考例 9]

目的：生体移植皮膚組織の機能的再生時における骨髓由来細胞寄与の評価

方法：上記の目的に対して以下の方法により研究を行った。

1) GFP骨髓移植マウスに対する生体皮膚移植系を利用して、移植皮膚片の機能的再生時の骨髓由来細胞寄与程度を検討した。具体的には、C57BL/6雄マウス(6~8週齢)に致死量放射線(10Gy)を照射し、その直後に尾静脈よりGFP (green fluorescent protein) トランスジェニックマウス由来骨髓細胞(5x10⁶個/0.1ml 生理的リン酸緩衝溶液pH7.4)を移植した。

2) 移植骨髓細胞の生着を待って(6週間)、得られたGFP骨髓移植マウスの背部皮膚に、新生マウス皮膚(雌)を移植した。

3) 移植皮膚片の生着と十分な皮膚組織再生を待って(4週間)、移植皮膚片領域におけるGFP蛍光の集積程度を、蛍光実体顕微鏡を利用して観察した。

4) 吸入麻酔下に移植皮膚片を生検により採取し、冷却装置付ミクロトームを用いて皮膚凍結切片 ($6\mu\text{m}$) を作製、4%パラホルムアルデヒド固定 (30分間)、組織内細胞核をDAPIで染色、蛍光退色防止剤入り封入材を用いて組織を封入した後共焦点レーザー顕微鏡によりGFP陽性骨髄由来細胞の存在を検討した。

[0122] 結果：GFP骨髄移植マウスへの生体皮膚移植系において、再生した皮膚組織の表皮角化細胞、真皮線維芽細胞、さらには平滑筋細胞や脂肪細胞の多くがGFP蛍光を示し、これらの細胞が骨髄由来であることが示された (図33)。即ち、移植皮膚の機能的再生時に必要な上皮系および間葉系細胞の多くが、骨髄由来幹細胞により供給されていた。

[0123] 考察：以上の結果は、皮膚損傷の際骨髄細胞は損傷部に集まり、皮膚を構築する様々な器官に分化することで皮膚の機能的再生に寄与することを示唆している。また、植皮皮膚片には様々な器官に分化可能な骨髄細胞を集める物質があることが予想される。

骨髄内には造血系幹細胞と間葉系幹細胞の二つの幹細胞システムが存在することが報告されている。今回の研究で示された、移植皮膚内に大量動員された骨髄由来上皮系細胞および間葉系細胞が骨髄由来造血系幹細胞から供給されていると予想するのは困難であり、移植組織の機能的再生には骨髄由来間葉系幹細胞が寄与している可能性が強く示唆される。即ち、植皮直後に疎血・壊死方向にある移植皮膚組織から骨髄由来間葉系幹細胞動員因子が放出され、骨髄から間葉系幹細胞を、末梢血液循環を介して移植皮膚片内に動員し、機能的皮膚組織再生を誘導していることが予想された。

[0124] [参考例10]

目的：皮膚組織抽出液内に存在する骨髄由来組織幹細胞誘導因子の同定

方法：疎血状態にある切除皮膚からの放出が予想される骨髄間葉系幹細胞動員因子の同定を目的として以下の方法のように研究を進めた。

1) マウス骨髄由来間葉系幹細胞を得るために、C57BL/6マウスの骨髄細胞を大腿骨もしくは下腿の骨から採取し、10%胎仔ウシ血清含D-MEM (Nacalai 社

製)を細胞培養培地として細胞培養皿に撒き、37°C、炭酸ガス濃度5%の条件下で培養した。細胞が占める面積が培養皿底面積に対して70から100%に増殖した時点で、0.25%トリプシン1mMEDTA (Nacalai社製)を用いて細胞を培養皿からはがし、さらに同じ条件で継代培養した。継代作業は少なくとも5回以上繰り返した。さらにこれらの付着細胞を単離培養しフローサイトメトリーによる細胞表面抗原の分析を行いLin陰性、CD45陰性、CD44陽性、Sca-1陽性、c-kit陰性であることを確認した。これらの細胞は骨細胞、脂肪細胞に分化可能で骨髄間葉系幹細胞の性質を有することを確認した。

2) 新生マウス(2日齢)5匹から得た遊離皮膚片を生理的リン酸緩衝液pH7.4 (PBS) 5ml内に浸し、4°Cで24時間インキュベーションした後、組織を取り除くために、4°Cの条件下で10分間、440Gで遠心し上清を回収して皮膚抽出液を作製した。また同様に、6週齢マウス1匹から得た遊離皮膚片を生理的リン酸緩衝液pH7.4 (PBS) 5ml内に浸し、4°Cで24時間インキュベーションした後、組織を取り除くために、4°Cの条件下で10分間、440Gで遠心し上清を回収して皮膚抽出液を作製した。

3) 得られた皮膚抽出液の中に骨髄間葉系幹細胞誘導活性が存在することを確認するため、ボイデン・チャンバーを用い、本発明者らが既に株化しているC57BL6マウス骨髄由来間葉系幹細胞に対する遊走活性を検討した。具体的にはボイデン・チャンバーの下槽(容量25 μ l)に2日齢もしくは6週齢のマウス皮膚抽出液(5 μ l)とDMEM(20 μ l)の混合液を挿入し、8 μ mの微細穴を持つポリカーボネートメンブレンを乗せ、さらにこれに接してボイデン・チャンバー上槽(容量50 μ l)を載せて、その中に骨髄由来間葉系幹細胞浮遊液(5x10⁴個/50ml培養液: DMEM/10%ウシ胎仔血清)を入れ、CO₂インキュベーター内で37°C、4~24時間培養した。培養後、チャンバーの上槽をはずし、シリコン薄膜を取り出して、その微細穴を通過してチャンバー下槽に遊走した骨髄由来間葉系幹細胞の数を染色により定量的に検討した(図34)。

[0125] 4) 2日齢マウス、6週齢マウスそれぞれの皮膚を約2cm²採取し、速やかに液体窒素で凍結後、乳鉢を用いて粉碎した。これらのサンプルからRNeasy (Qia

gen)を用いてRNAを抽出精製した。精製したRNAを用いてマイクロアレイアッセイにより2日齢マウスでより多く発現しているmRNAをスクリーニングした。2日齢マウスの方が2倍以上のスコアが高い遺伝子は767あった。これらの遺伝子のうち、ヘパリンに親和性の高いタンパク質、分泌される可能性のあるタンパク質、2日齢マウスの方が6倍以上スコアが高い遺伝子を検討したところ上位57番目の遺伝子としてS100A9が存在した。そこで、S100A9及びS100A8とヘテロダイマーを形成することで知られているS100A8の2日齢皮膚抽出液中の存在をWestern blot 法で検出した。すなわち、2日齢皮膚抽出液5 μ lとSDS-PAGE sample buffer 5 μ l(Bio-Rad)を混合し、98°C、5分間ヒートブロックで熱した後、25°Cにまで冷却した。このサンプルを12.5% アクリルアミドゲルのe-PAGEL(ATT0)にアプライし、電気泳動装置(ATT0)を用いて、40 mA で75分間電気泳動した。電気泳動後ゲルを回収し、ブロッティング装置(ATT0)を用いて、あらかじめ100% メタノールにて処理した縦7cm 横9cmのPVD F膜(Millipore)にゲル中のタンパク質を転写した。転写は120mA、75分間施行した。転写終了後、PVDF膜を回収し、4%スキムミルク含PBS(nacalai)中で30分間室温振盪した。その後、抗S100A8抗体(R&D)もしくは抗S100A9(R&D)5 μ lを10mLの4%スキムミルク含PBSに希釈した液中に回収したPVDF膜を浸し、60分間室温振盪した。抗体液を除去後、30 mL の0.1% Tween 20 含PBSで膜を5分間室温で振盪し洗浄した。洗浄は5回繰り返した。洗浄後、HRP標識抗goat IgG 抗体(GE healthcare)5 μ lを10mLの4%スキムミルク含PBSに希釈した液中に膜を入れ室温で45分間振盪した。抗体液を除去後、30 mL の0.1% Tween 20 含PBSで膜を5分間室温で振盪し洗浄した。洗浄は5回繰り返した。膜をECL検出キット(GE healthcare)にて発光させフィルムを感光させた。現像装置でフィルムを現像し、S100A8及びS100A9のタンパク質のシグナルを得た(図35)。

[0126] 5) 皮膚抽出液内の骨髓由来間葉幹細胞動員活性をもつ因子を精製するために、ヘパリンアフィニティーカラム・クロマトグラフィーを施行した。以下の操作は、FPLC装置(GE healthcare)を用いて施行した。まず、2日齢マウ

ス皮膚抽出液を4°Cの9倍容20 mM リン酸バッファー pH 7.5を用い 10倍に希釈した（希釈液A）。あらかじめ、20 mM リン酸バッファー pH 7.5（300ml）をHiPrep 16/10 Heparin FF（GE Healthcare）の中に流しカラムを平衡化した。さらに、希釈液Aをカラムに結合させた。その後20 mM リン酸バッファー pH 7.5,（300ml）でカラムを洗浄した。吸着したタンパク質を溶出するため、（A液）20 mM リン酸バッファー pH 7.5, 10mM NaCl と（B液）20 mM リン酸バッファー pH 7.5, 500mM NaClを作製した。はじめA液100%/B液0%で送液し、徐々にB液の割合を増加し最終的にA液0%/B液100%で送液した。総送液量は150mLとした。溶出液はシリコンコートしたチューブに3mLずつ分画した。分画したサンプルのそれぞれ5 μ l とSDS-PAGE sample buffer 5 μ l (Bio-Rad)を混合し、98°C、5分間ヒートブロックで熱した後、25°Cにまで冷却した。このサンプルを（5-20% gradient）アクリルアミドゲルのe-PAGEL (ATTO)にアプライし、電気泳動装置（ATTO）を用いて、40mA で75分間電気泳動した。泳動後、Dodeca silver stain kit(Bio-Rad)を用いて泳動したタンパク質を検出した（図36）。

分画したサンプルをそれぞれ、上記と同様にボイデン・チャンバーを利用した遊走活性を評価した（図37）。

分画したサンプルをそれぞれ、上記と同様にWestern blot法を用いてS100A8とS100A9のタンパク質の存在を検出した（図38）。

[0127] 6) 新生マウス皮膚からTrizol (Invitrogen) を用いてRNA を抽出し更にSuperScript III cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いてcDNA を合成した。このcDNA をテンプレートとしてS100A8及びS100A9のcDNAをPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を用いて増幅し、アミノ酸配列のN末端にGST tagの配列（配列番号：31（アミノ酸配列）、配列番号：32（DNA配列））を付加したタンパク質を発現するように、哺乳類細胞でタンパク質を発現させるプラスミドベクターpCAGGSに挿入した（図39）。ヒト胎児腎細胞由来HEK293培養細胞株にリポフェクション試薬（Invitrogen）を用いてpCAGGS-GST-S100A8もしくはpCAGGS-GST-S100A9をトランスフェクションし、48時間後細胞及び培養上清

を回収した。細胞及び培養上清は4°Cで4400g・5分間遠心し上清（上清A）と細胞を分離しそれぞれ回収した。細胞は0.1%Tween20含PBSを加え氷冷下で30秒間超音波をあてることで細胞膜を破壊した。さらに、4°Cで4400g・5分間遠心し上清を回収した（上清B）。上清Aおよび上清Bを混合し、あらかじめ30mLのPBSでバッファーを置換したHiTrap GST FF column（GE healthcare, 5mL）に添加した。添加後PBS100mLでカラムを洗浄し、還元型グルタチオン含20mMリン酸バッファー（pH. 8）で吸着したタンパク質を溶出した。リコンビナントS100A8およびS100A9のボイデン・チャンバーを用いた、骨髄間葉系幹細胞遊走活性を検討した。ボイデン・チャンバーの下層には、精製したS100A8およびS100A9タンパク質を0.1ng/ μ Lの濃度に調整しDMEMに溶かしたサンプルもしくは2日齢マウス皮膚抽出液は4倍容のDMEMで希釈したサンプルを挿入した。Negative controlはS100AおよびS100A9 cDNAを挿入していないコントロールベクターをトランスフェクションした細胞からタンパク質を抽出し、HiTrap GST FF columnから溶出した画分を同様に用いた。下層にサンプルを挿入後、8 μ mの微細穴を持つポリカーボネートメンブレンを乗せ、さらにこれに接してボイデン・チャンバー上槽（容量50 μ l）を載せて、その中に骨髄由来間葉系幹細胞浮遊液（5 $\times$ 10⁴個/50ml培養液：DMEM/10%ウシ胎仔血清）を入れ、CO₂インキュベーター内で37°C、4～24時間培養した。培養後、チャンバーの上槽をはずし、ポリカーボネートメンブレンを取り出して、その微細穴を通過してチャンバー下槽に遊走した骨髄由来間葉系幹細胞の数を染色により定量的に検討した（図40）。

- [0128] 7) 前述の精製したGST-S100A8およびS100A9リコンビナントタンパク質を8週齢雄マウスの尾静脈から250 μ L(1ng/ μ L)注入した。12時間後イソフルランに容吸入麻酔下に、マウスの心臓からヘパリンコートした1mLのシリンジを用いて、末梢血1mLを採血し、3mLのPBSと混合した後、3mLのFicol(GE healthcare)の上に静かに重層した。遠心機を用い、25°Cで400g、40分間遠心した。中間層の白濁した層の細胞を単核球画分として回収した。回収した細胞に1mLの溶血剤であるHLB solution（免疫生物研究所）を加え室温で5分インキュベ

ートした。この溶血操作を2回繰り返した。10mLのPBSを加え、25°Cで440g、5分間遠心し上清を除去して細胞を回収した。この細胞1,000,000個に抗マウスPE標識PDGFR α 抗体(e-Bioscience)、PE標識抗マウスPDGFR β 抗体(e-Bioscience)、FITC標識抗マウスCD45抗体(BD biosciences)、PerCy5標識抗マウスCD44抗体(BD biosciences)それぞれをPBSで100倍希釈し20分間室温でインキュベートした。その後この細胞を25°C、440g、5分間遠心し上清を除去した。1%パラホルムアルデヒド含PBSを400 μ L加え、フローサイトメトリー解析のサンプルとした。抗体は(I) PDGFR α /CD45/CD44 (II) PDGFR β /CD45/CD44の組み合わせで使用した。解析結果はCD45弱陽性-陰性細胞に対してのPDGFR α (もしくは β) 及びCD44の発現細胞の割合を検討した(図4 1 A, 図4 1 B)。

[0129] 結果：切除した2日齢マウス皮膚及び6週齢マウス皮膚の骨髄間葉系幹細胞の遊走活性を検討し、6週齢マウスに比べ2日齢マウスの皮膚抽出液に強い活性を見出した。DNAマイクロアレイの結果からS100A9が2日齢マウス皮膚で強い発現が認められた。皮膚抽出液をヘパリンカラムで粗精製したサンプルの間葉系幹細胞遊走活性とS100A9及びS100A8の含有に相関が認められた。これらのタンパク質の発現ベクターを作製し、HEK293を用いてリコンビナントタンパク質を生産精製した。これらのS100A8・S100A9精製品はボイデン・チャンバーを用いたアッセイにおいて骨髄間葉系幹細胞遊走活性を有していた。また、マウス静脈投与によってもPDGFR α 、CD44陽性細胞群を末梢血中に動員する活性が認められた(図4 1)。

[0130] 考察：今回本発明者らは、世界で初めて、遊離皮膚片がS100A8およびS100A9を産生し、産生されたS100A8およびS100A9は骨髄由来間葉系幹細胞を遊走する強い活性を有することを見出した。また、骨髄間葉系幹細胞は骨組織、脂肪組織、軟骨組織、線維芽細胞等に分化する多能性幹細胞であることが知られているが、最近骨髄由来細胞の中には、心筋、神経細胞、表皮細胞等の組織にも分化する多能性幹細胞も存在することも指摘されている。今回植皮片の表皮細胞、毛包細胞、皮下組織の線維芽細胞などが骨髄由来の細胞で構成されていることから、S100A8やS100A9が骨髄由来組織幹細胞を植皮片に動員

し、損傷組織の機能的修復を誘導していると考えられる。S100A8およびS100A9は静脈注射による投与で末梢血中に骨髓間葉系幹細胞を動員可能なため、局所投与が困難な深部組織（脳、心臓、脊髄など）にも末梢循環を介して投与可能である。本技術を医薬品として利用することで、損傷組織再生時に間葉系幹細胞を含む骨髓由来組織幹細胞を局所に動員することが可能になれば、皮膚組織の組織損傷治癒のみならず脳、筋肉、骨などの様々な組織損傷治癒過程において治癒期間の短縮、損傷組織の機能的再生などの効果が期待されると確信する。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）から（q）のいずれかに記載の物質を含有する組織再生促進剤であって、再生が必要な組織とは異なる組織に投与される薬剤；
- （a）HMGB1タンパク質
 - （b）HMGB1タンパク質を分泌する細胞
 - （c）HMGB1タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - （d）HMGB2タンパク質
 - （e）HMGB2タンパク質を分泌する細胞
 - （f）HMGB2タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - （g）HMGB3タンパク質
 - （h）HMGB3タンパク質を分泌する細胞
 - （i）HMGB3タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - （j）S100A8タンパク質
 - （k）S100A8タンパク質を分泌する細胞
 - （l）S100A8タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - （m）S100A9タンパク質
 - （n）S100A9タンパク質を分泌する細胞
 - （o）S100A9タンパク質をコードするDNAが挿入されたベクター
 - （p）細胞又は組織の抽出液
 - （q）細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分。
- [請求項2] 非経口投与される、請求項 1 記載の薬剤。
- [請求項3] 注射投与である、請求項 2 記載の薬剤。
- [請求項4] 血管内、筋肉内、皮下、皮内又は腹腔内に投与される、請求項 1 記載の薬剤。
- [請求項5] 細胞又は組織の抽出液が細胞又は組織を溶媒に浸す工程を含む方法で製造される、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の薬剤。
- [請求項6] 細胞又は組織の抽出液のヘパリン結合画分が以下の工程を含む方法で

製造される、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の薬剤；

（a）細胞又は組織を溶媒に浸す工程、

（b）工程（a）で得られる抽出液を固定化ヘパリンに接触させる工程、および

（c）固定化ヘパリンからヘパリン結合画分を溶出する工程。

[請求項7] 神経組織、骨組織、又は皮膚組織の再生促進に用いられる、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の薬剤。