

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/060252

発行日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)

(43) 国際公開日 平成28年4月21日 (2016. 4. 21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/24 (2006.01)	A 6 1 L 27/24	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/54 (2006.01)	A 6 1 L 27/54 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

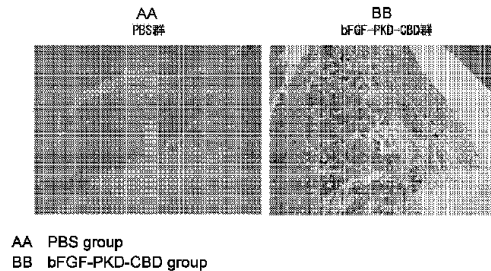
出願番号	特願2016-554137 (P2016-554137)	(71) 出願人	598041566 学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/079334	(71) 出願人	399072222 株式会社アトリー 東京都渋谷区広尾一丁目12番16号 ハ ナサキビル3F
(22) 国際出願日	平成27年10月16日 (2015. 10. 16)	(71) 出願人	504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(31) 優先権主張番号	特願2014-212085 (P2014-212085)	(71) 出願人	304028346 国立大学法人 香川大学 香川県高松市幸町1番1号
(32) 優先日	平成26年10月16日 (2014. 10. 16)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経再生用移植材料、神経再生用移植材料の製造方法、及び神経再生用移植材料製造用キット

(57) 【要約】

1) 配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備することを特徴とする神経再生用移植材料。2) 配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を含有する溶液に浸漬させて、前記コラーゲンに前記コラーゲン結合部位含有成長因子を結合させる工程を有する神経再生用移植材料の製造方法。3) 配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材、及び受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子、を備えたことを特徴とする神経再生用移植材料製造用キット。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備する神経再生用移植材料。

【請求項 2】

前記コラーゲンに、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子が結合してなる請求項 1 に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 3】

中空の筒体形状を有し、該筒体の内面の少なくとも一部が前記コラーゲン基材により構成された請求項 1 又は 2 に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 4】

前記コラーゲンが、前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有する請求項 3 に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 5】

前記コラーゲン結合部位含有成長因子は、前記成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とがリンカー部を介して結合されたものであり、

前記リンカー部が、コラゲナーゼの多発性嚢胞腎ドメインである請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 6】

前記成長因子受容体アゴニストペプチド部は、塩基性線維芽細胞増殖因子である、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 7】

前記コラーゲン基材は、複数のコラーゲン基材層からなる請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 8】

前記コラーゲン基材の厚みが、50 μm 以上、200 μm 以下である請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項 9】

配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を含有する溶液に浸漬させて、前記コラーゲンに前記コラーゲン結合部位含有成長因子を結合させる工程を有する神経再生用移植材料の製造方法。

【請求項 10】

配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材、
及び受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子、
を備えた神経再生用移植材料製造用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、神経再生用移植材料、神経再生用移植材料の製造方法、及び神経再生用移植材料製造用キットに関する。

本願は、2014年10月16日に、日本に出願された特願2014-212085号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】**【0002】**

交通外傷や腫瘍切除に伴う神経損傷に対し、健常な神経組織を移植する自家神経移植術が行われている。しかし、ドナーとして用いることのできる神経組織の長さや径に限度があることやドナー採取部位の損傷が問題となっている。近年、生体材料からなる人工神経が開発されているが、十分な成績は得られていない。

10

20

30

40

50

一方、神経損傷の自己修復を促進させる試みも従来行われてきた。特許文献1には、コラーゲンを神経再生の足場として使用する神経再生誘導管が開示されている。特許文献2及び3には生分解性ポリマー繊維から編成された管状体にコラーゲンが塗布、充填等されてなる神経再生誘導管が開示されている。

【0003】

また近年、生体移植材料として利用可能な、配向性を有するコラーゲンの開発が行われてきた(特許文献4及び特許文献5)。特許文献5においては、配向性を有するコラーゲンの生体適合材料への利用として、骨芽細胞又は間葉系幹細胞を播種することにより、コラーゲンの配向性の方向と略一致した配向性を有するアパタイトを、前記コラーゲンの表面及び/又は内部に生成・固定させたコラーゲン/アパタイト配向性材料の製造方法が開示されている。これは、骨組織に類似した特徴を有する生体適合性材料を提供するものである。

神経欠損は時間経過とともに重度の機能障害をもたらし、患者の生活の質を著しく低下させることに加え、長期にわたる治療は患者の社会復帰遅延、医療費増加に直結する。したがって、例えば、より早期に神経損傷を回復させることのできる技術の開発が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特許第4572996号公報

【特許文献2】特許第4596335号公報

【特許文献3】特許第4640533号公報

【特許文献4】国際公開第2012/114707号

【特許文献5】特開2012-65742号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明はこのような事情に鑑みてなされたものであり、効率的に神経再生を可能にする神経再生用移植材料の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、従来神経再生用として用いられることの無かった配向性を有するコラーゲン線維を含むコラーゲン基材を、神経再生用移植材料に備えることで、効率的な神経損傷部位の再生を実現可能であることを見出し、本発明を完成させた。すなわち本発明は以下の通りである。

【0007】

(1) 配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備する神経再生用移植材料。

(2) 前記コラーゲんに、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子が結合してなる前記(1)に記載の神経再生用移植材料。

(3) 中空の筒体形状を有し、該筒体の内面の少なくとも一部が前記コラーゲン基材により構成された前記(1)又は(2)に記載の神経再生用移植材料。

(4) 前記コラーゲンが、前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有する前記(3)に記載の神経再生用移植材料。

(5) 前記コラーゲン結合部位含有成長因子は、前記成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とがリンカー部を介して結合されたものであり、

前記リンカー部が、コラゲナーゼの多発性囊胞腎ドメインである前記(2)～(4)のいずれか一つに記載の神経再生用移植材料。

(6) 前記成長因子受容体アゴニストペプチド部は、塩基性線維芽細胞増殖因子である、前記(2)～(5)のいずれか一つに記載の神経再生用移植材料。

(7) 前記コラーゲン基材は、複数のコラーゲン基材層からなる前記(1)~(6)のいずれか一つに記載の神経再生用移植材料。

(8) 前記コラーゲン基材の厚みが、50 μm以上、200 μm以下である前記(1)~(7)のいずれか一つに記載の神経再生用移植材料。

(9) 配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を含有する溶液に浸漬させて、前記コラーゲンに前記コラーゲン結合部位含有成長因子を結合させる工程を有する神経再生用移植材料の製造方法。

(10) 配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材、

及び受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子、
を備えた神経再生用移植材料製造用キット。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、神経再生効率に優れた神経再生用移植材料を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】実施例において作製した配向性コラーゲンチューブAの外観を写した写真である。

【図2】(a)移植から12週経過後の配向性コラーゲンチューブ移植部分の肉眼所見(写真)である。(b)移植から12週経過後の配向性コラーゲンチューブ移植部分のHE染色像である。(c)図2(b)に示すHE染色像枠内の拡大画像である。

【図3】神経節細胞のFAST Blue 標識像である。

【図4】配向性コラーゲンチューブ移植後のラットに対する運動機能の評価結果を示すグラフである。

【図5】溶液中に添加したbFGF-PKD-CBD融合タンパク質量と、配向性コラーゲンチューブへ結合したbFGF-PKD-CBD融合タンパク質量の関係を示すグラフである。

【図6】配向性コラーゲンチューブ移植後のラットに対するvon Frey filamentによる行動学的評価結果を示すグラフである。

【図7】コラーゲンチューブ移植部分に再生した神経のトルイジンブルー染色像である。

【図8】CBDを有する細菌性コラゲナーゼの分子系統樹、及びそれらのドメインを示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

神経再生用移植材料

<コラーゲン基材>

本発明の神経再生用移植材料は、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備するものである。

【0011】

配向性を有するコラーゲンとは、単体のコラーゲングル、乾燥コラーゲングルなどの線維状コラーゲンの走行方向がある方位に揃っているコラーゲンを意味する。配向性を有するコラーゲンが、金属、セラミックス、高分子材料、又は生体材料からなる基板にコートされている場合(コラーゲン基板ともいう。)には、配向性を有するコラーゲンとは、各種形状に加工された金属、セラミックス、高分子材料、又は生体材料等の基板にコートされたコラーゲングル、乾燥コラーゲングルなどにおける線維状コラーゲンの走行方向がある方位に揃っているコラーゲンを意味する。

線維状コラーゲンの走行方向がある方位に揃っているとは、コラーゲン基材において、ある方位へ走行する線維状コラーゲンの割合が、別の方位へ走行する線維状コラーゲンの割合よりも高い状態をいう。

10

20

30

40

50

なお、線維状コラーゲンの「走行方向」と、配向性の方向、方位、配向、配向性、配向性の向きとは、同じ意味で用いている。

【0012】

配向性を有するコラーゲンを準備する方法は、常法により特に限定されない。例えば、ミリメートルオーダー以上のコラーゲンを配向性を与えるには、コラーゲン溶液をゲル化する過程でコラーゲン溶液に一定方向の流れを与える方法が提案されているが、他の方法としてもよい。他の方法としては、コラーゲン線維が形成される過程において強力な磁場を印加する方法、コラーゲンをスピンコートする方法、コラーゲンを一定方向にメカニカルに（物理的に）延伸する方法などを挙げることができる。

【0013】

コラーゲン線維が形成される過程において強力な磁場を印加する方法により、配向性を有するコラーゲン断片を準備する場合、磁場に対してコラーゲン線維は垂直に配列するので、磁場を同じ方向からかけ続けると2次元の配列になり、回転磁場を与えると1軸配向となる。このような配向を有するコラーゲンを、出発材料として用いたい場合に磁場を用いた方法を使用可能である。但し、磁場であれば、基本的には均一な配列をもったもののみ作製が可能で、マクロ形状も限定される傾向にある。これに対して、コラーゲン溶液をゲル化する過程でコラーゲン溶液に一定方向の流れを与える方法によって、配向性を有するコラーゲンを準備する場合、液体の流れを利用するためシート状の形状を含む様々な形状やそれを積層させることで、3次元的に配向性の異なるコラーゲンを作製可能である。

【0014】

このような方法においては、配向性コラーゲン（コラーゲン単体）は、コラーゲン溶液の流れを利用してコラーゲンを固めるプロセスで配向性を与えることによって得ることができる。これにより、ストリング形状、幅の広いリボン形状等、各種形状（線、面、立体）の配向性コラーゲン又はコラーゲン断片の作製が可能である。また、その際に、流れの速度を制御することで、配向性の程度を制御することも可能である。そのため、同一コラーゲン内においても、配向性の方向、配向性の程度を制御して分布をもたせることは可能である。

【0015】

例えば、コラーゲン溶液をゲル化する過程でコラーゲン溶液に一定方向の流れを与える方法において説明すると、コラーゲン溶液の濃度は、得られるコラーゲン又はコラーゲン基板が十分な機械的強度を有するためには10mg/ml以上が好ましいが、3mg/ml程度以上のものであってもよい。コラーゲンの由来は問わない。また、由来する動物の種、組織部位、年齢等は特に限定されない。例えば、ラット尾、豚皮、牛皮、ダチョウ、魚などの動物等から抽出したものを使用できる。すなわち、哺乳動物（例えばウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ネズミ等）や鳥類（例えばニワトリ等）の皮膚、骨、軟骨、腱、臓器等から得られるコラーゲンを使用できる。また魚類（例えばタラ、ヒラメ、カレイ、サケ、マス、マグロ、サバ、タイ、イワシ、サメ等）の皮、骨、軟骨、ひれ、うろこ、臓器等から得られるコラーゲン様蛋白を使用してもよい。なおコラーゲンの抽出方法は特に限定されず、一般的な抽出方法を使用することができる。また動物組織からの抽出ではなく、遺伝子組み替え技術によって得られたコラーゲンを使用してもよい。また、抗原性を抑えるために酵素処理したアテロコラーゲンをを用いることができる。また、コラーゲンとしては酸可溶性コラーゲン、中性塩可溶性コラーゲン、酵素可溶化コラーゲン（アテロコラーゲン）等の未修飾可溶性コラーゲン、サクシニル化、フタル化等のアシル化、メチル化等のエステル化、アルカリ可溶化の脱アミド化等の化学修飾コラーゲン、さらにテンドンコラーゲン等不溶性のコラーゲンをを用いることができる。さらにコラーゲン溶液に化学架橋剤、薬剤、酸素等の気泡を導入することもできる。導入方法は常法により特に限定されない。

【0016】

得られたコラーゲンの配向性の方位、配向性の程度は、例えば、ラマン分光顕微鏡によって定量的に評価が可能である。ラマン分光とは、分子に当たって散乱される光が分子の

10

20

30

40

50

振動によって周波数変調を受けた成分を含むことを分光器によって調べることであり、分析対象の組成や結晶構造の情報を得ることができ、コラーゲンの配向性についても分析が可能となる。

【0017】

本発明の神経再生用移植材料は、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備しているため、コラーゲンの配向性に沿った神経細胞及び神経組織の再生を促すことができる。このときコラーゲン基材は、神経細胞の足場としての役割を果たすことができると考えられる。神経再生では空間的な配置の再生も重要となるため、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材の利用は、大変有用である。神経損傷の修復を行う場合、例えば、神経の切断部位に神経再生用移植材料を配置し、本来の神経が通っていた方向とコラーゲンの配向とを合わせることで、より効率的に神経の再生を実現できる。

10

【0018】

(形状)

本発明の神経再生用移植材料の形状は特に制限されず、リボン、シート、チューブ、スポンジ、グレイン(粒)、ロッド、リング、スパイラル、スプリング(バネ)、ディスク、ドーム又はブロック等の形状を有し得る。

【0019】

上記に挙げた形状の作製にあたっては、例えば、まずストリング形状のものからシート状のコラーゲン材料(断片)を作製し、当該コラーゲン材料をさらに加工して種々の最終形状の3次元コラーゲン材料を作製することができる。3次元コラーゲン材料の作製は、国際公開第2012/114707号に挙げられた方法を採用することができる。

20

【0020】

本発明の神経再生用移植材料は、上記に例示した形状のなかでも、中空の筒体形状(チューブ形状)を有することが好ましい。さらには、該筒体の内面の少なくとも一部又は全部が前記コラーゲン基材により構成されたものであることが好ましい。また、該筒体の内表面の少なくとも一部又は全部が前記コラーゲン基材により構成されたものであることが好ましい。筒体形状を有する神経再生用移植材料では、その筒体内部に神経再生させることができる。筒体は周囲の組織が筒体内部へと侵入することを防ぎ、同時に筒体内部では神経を保持できるので、より効率的に神経を再生させることができる。

【0021】

神経再生用移植材料が中空の筒体形状を有している場合、前記コラーゲンが、前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有することが好ましい。筒体の両端の開口部を結ぶ方向は、例えば神経の欠損部分に筒体の神経再生用移植材料を挿入したときに、欠損した神経の末端同士を結ぶ方向となるため、より効率的に神経の再生を実現することができる。

30

【0022】

神経再生用移植材料が中空の筒体形状を有している場合とは、コラーゲン基材自体が筒体形状を有している場合が挙げられる。この場合、該コラーゲン基材は継ぎ目のないシームレスチューブであることが好ましい。継ぎ目とは、板状のコラーゲン基材の端を接続して筒体形状とする際に形成される、端同士の結合部である。シームレスチューブでは、チューブ内面で細胞成長がよりスムーズとなるため好ましい。

40

【0023】

本発明の神経再生用移植材料は、生分解性材料からなり、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備するものであることがより好ましい。生分解性材料からなる神経再生用移植材料は、神経の再生が達成された後に、移植先の生体内で分解されるので、移植後の被移植者の負担を軽減できる。

【0024】

また、本発明の神経再生用移植材料が備える前記コラーゲン基材は、複数のコラーゲン基材層からなるものであってもよい。コラーゲン基材の重層化により、コラーゲン基材の厚み、強度等の物性を、容易に調整可能である。したがって、他の支持体を用いることな

50

く、生分解性であるコラーゲン基材の調整のみで神経再生用移植材料の物性を調整可能である。

【0025】

例えば、神経再生用移植材料の一実施形態として、中空の筒体形状を有し、該筒体の内面の少なくとも一部が前記コラーゲン基材により構成され、前記コラーゲンが前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有し、前記コラーゲン基材が複数のコラーゲン基材層からなるものを例示できる。このとき、筒体の最内面のコラーゲン基材層のコラーゲンは、筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有していることが好ましい。最内面のコラーゲン基材層以外の層のコラーゲンは、配向性を有していてもよいし、有していなくてもよい。最内面のコラーゲン基材層以外の層のコラーゲンが配向性を有している場合、最内面のコラーゲン基材層以外の層のコラーゲンの配向性の向きは特に制限されない。しかし、最内面の層が生分解され、最内面のコラーゲン基材層以外の層が筒体の内面に露出することを考慮した場合には、最内面のコラーゲン基材層以外の層のコラーゲンも、前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有していることが好ましい。一方、縫合性など強度を高めることを考慮した場合、最内面のコラーゲン基材層以外の層のコラーゲンは、前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向以外の方向に配向性を有していることが好ましい。

10

【0026】

このように、コラーゲン基材を重層化させることで、神経再生用移植材料の機能性をより高めることができる。

【0027】

コラーゲン基材の厚みは、50 μm 以上であることが好ましく、70 μm 以上であることがより好ましい。

20

コラーゲン基材の厚みは、200 μm 以下であることが好ましく、170 μm 以下であることがより好ましく、130 μm 以下であることがさらに好ましい。

コラーゲン基材の厚みは、50 μm 以上200 μm 以下であることが好ましく、70 μm 以上170 μm 以下であることがより好ましく、70 μm 以上130 μm 以下であることがさらに好ましい。通常、50 μm 以上の厚みであると、移植操作が容易となり好都合である。また、通常200 μm 以下の厚みであると、生分解に要する時間が長すぎることなく生体への負担が軽減されるため好ましい。

コラーゲン基材の厚みは、乾燥状態コラーゲン基材の無作為に選択した10か所程度の厚みを測定し、その平均値として求めることができる。

30

コラーゲン基材が重層化している場合、コラーゲン基材の厚みとは、重層化した層全体の厚みを指す。コラーゲン基材が重層化している場合、単層の厚みを、目安として10～15 μm 程度とすることを例示できる。

【0028】

本発明においては、コラーゲン基材は、乾燥状態での提供を基本とするが、乾燥状態にあるコラーゲン基材をPBS等に浸漬することによりゲル状の状態でも提供可能である。

本明細書中、乾燥状態のコラーゲン基材とは、水分含量が0～30質量%のコラーゲン基材をいう。水分含量は、常圧加熱乾燥法により求めることができる。

通常、乾燥するとコラーゲン基材の組織が一部破壊除去される可能性はあるが、保存性（形状維持が容易、またゲルのままでは水分を含んでいるので腐敗しやすい）、輸送性（ゲルだと水分を含んでいるので壊れやすい、容器にひっついて剥がす時に変形する等）の観点から乾燥材料のほうが扱いやすいといえる。

40

本発明において、乾燥状態のコラーゲン基材は、実際に使用する時にPBS、培養液でゲルに戻して使用することが可能である。本発明において、乾燥状態のコラーゲン基材は、乾燥させることにより、ゲルの水分が抜けて、コラーゲン線維組織が緻密になり、再度PBS、培養液でゲルに戻しても、元の体積よりも小さく、結果として組織の緻密さが残され、強度において、そして配向性において、製作時のゲルより優れることが多いといえる。

このように本発明においては、特徴として、乾燥状態でコラーゲン基材を提供すること

50

も可能である一方、PBS、培養液でゲルに戻してから提供することも可能である。

【0029】

<コラーゲン結合部位含有成長因子>

本発明の神経再生用移植材料は、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備し、前記コラーゲンに、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子(Collagen-binding Growth factor;以下「CB-GF」とも称する。)が結合してなる「成長因子アンカーリング型神経再生用移植材料」であってもよい。

成長因子アンカーリング型神経再生用移植材料は、前記コラーゲン基材の有する神経再生作用に加え成長因子による相乗的な神経再生作用を期待することができる。しかも、成長因子は、コラーゲン基材のコラーゲン線維に結合しているため移植部に長く留まり、継続的な神経再生を促すことができる。

【0030】

ここで、コラーゲン基材に結合させるCB-GFの量に限定はないが、コラーゲン基材1mg(乾燥重量)にCB-GFを0.01~1ナノモル、好ましくは0.1~1ナノモル、より好ましくは0.5~1ナノモル結合したものであることが好ましい。1ナノモル以下で前記CB-GFが結合すると、神経再生の増加率が好ましく、一方、0.01ナノモル以上で前記CB-GFが結合すると、より効果的に神経再生効果が発揮される。

【0031】

(CB-GF)

CB-GFは、成長因子受容体のアゴニストペプチド部(以下、「GF部」とも称する。)とコラーゲン結合性ペプチド部(以下、「CB部」とも称する。)とを含むものであればその構造や製造方法に特に制限はなく、両ペプチド部が化学的に結合されたものであってもよく、GF部とCB部とを含む融合タンパクであってもよい。この際、たとえば、CB部が、直接またはポリペプチド断片からなるリンカー部を介して、GF部に連結されるものであってもよい。更に、GF部とCB部という二つのポリペプチドを、アミノ基を介してジスクシンイミドイルグルタレートやグルタルアルデヒドを含む試薬により架橋結合するものであってもよい。また、一つのポリペプチドをスクシンイミドイル-4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾンにより、もう一方のポリペプチドをスクシンイミドイル-4-フォルミルベンゾエートにより誘導化した後に、二つの誘導化されたポリペプチドを混合し、アミノ基を介して架橋結合してもよい。なお、上記以外にGF部とCB部とを結合するために、ポリペプチド以外の架橋剤その他の化合物でこれらを連結してもよい。

【0032】

(コラーゲン結合性ペプチド部)

CB-GFを構成する「コラーゲン結合性ペプチド部」は、コラーゲン基材のコラーゲン線維に成長因子受容体アゴニストペプチド部を結合させるための結合部として機能する部位である。前記したように、成長因子は神経再生作用を示すが、静脈注射などによって全身投与すると局所残存率が低く、持続的な神経再生作用を期待することができない場合がある。

しかしながら、CB-GFを使用すれば、CB-GFに含まれるCB部を介して架橋剤その他の化学的成分を使用せずにコラーゲン基材のコラーゲン線維にGF部を結合させることができる。成長因子アンカーリング型神経再生用移植材料は後述のように製造が容易であり、かつ架橋剤を使用しないため安全性に優れる。

【0033】

なお、「CB部」とは、コラーゲン線維の少なくとも一部と結合するものを広く対象とすることができる。コラーゲン線維と結合するポリペプチドとしては、例えば、コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合部位などを例示することができる。コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合部位の構造遺伝子の例としては、配列番号1に示す*Clostridium histolyticum*コラゲナーゼ(以下、「ColH」と称する場合がある。)遺伝

10

20

30

40

50

子 (GenBank アクセション番号 D29981) の 3001 番目 ~ 3366 番目の塩基配列を含む DNA 断片がある。この DNA 断片は、GenBank のアクセション番号 BAA06251 で特定されるアミノ酸配列をコードするものであり、図 8 に示すように、CD で示される触媒部位と、CBD で示されるコラーゲン結合部位とを含む。配列番号 1 の塩基配列に併記するアミノ酸配列の 901 番目 ~ 1021 番目のアミノ酸配列が CBD に該当する。同様に、GenBank のアクセション番号 BAA77453 で特定される *Clostridium histolyticum* コラーゲナーゼ (以下、「ColG」と称する場合がある。)、同アクセション番号 BAC57532 で特定される *Clostridium limosum* コラーゲナーゼ、同 BAC57535 で特定される *Clostridium septicum* コラーゲナーゼ、同 A36866 で特定される *Clostridium perfringens* コラーゲナーゼ、同 BAC57545 で特定される *Clostridium novyi* コラーゲナーゼ、同 BAC57541 で特定される *Clostridium bifermentans* コラーゲナーゼ、同 BAC57550 で特定される *Clostridium sordelli* コラーゲナーゼ、同 AA037456 で特定される *Clostridium tetani* コラーゲナーゼ、同 YP__001254122 で特定される *Clostridium botulinum* コラーゲナーゼ、同 BAC57538 で特定される *Clostridium sporogenes* コラーゲナーゼ、同 NP__833262 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、同 NP__979836 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、同 NP__833262 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、同 NP__979836 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、同 NP__845854 で特定される *Bacillus anthracis* コラーゲナーゼ、同 YP__037608 で特定される *Bacillus thuringiensis* コラーゲナーゼ、同 NP__832902 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、同 NP__845590 で特定される *Bacillus anthracis* コラーゲナーゼ、同 NP__830373 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、同 YP__034814 で特定される *Bacillus thuringiensis* コラーゲナーゼ、同 NP__843090 で特定される *Bacillus anthracis* コラーゲナーゼ、同 NP__976942 で特定される *Bacillus cereus* コラーゲナーゼ、その他の細菌性コラーゲナーゼに由来するコラーゲン結合性ペプチド部も同様に使用することができる。なお、「CB部」は、コラーゲン基材のコラーゲン線維に成長因子を保持しうる程度に結合できればよく、従って、コラーゲナーゼ由来のコラーゲン結合部位の全てのアミノ酸配列を含む必要はない。例えば、前記コラーゲン結合性ペプチド部は、上記構造遺伝子のコードするアミノ酸配列における CBD を構成する塩基配列と 80% 以上、90% 以上、95% 以上、又は 98% 以上の相同性を有し、且つコラーゲン基材のコラーゲン線維に成長因子を保持しうる程度に結合できるものを好適に使用することができる。また例えば、前記コラーゲン結合性ペプチド部は、上記構造遺伝子のコードするアミノ酸配列における CBD を構成するアミノ酸配列と 80% 以上、90% 以上、95% 以上、又は 98% 以上の相同性を有し、且つコラーゲン基材のコラーゲン線維に成長因子を保持しうる程度に結合できるものを好適に使用することができる。結合方法は問わず、例えば、コラーゲン基材の表面から露出するコラーゲン線維の一部と親和性を有して結合するものであってもよい。配列同士の相同性は、公知のシーケンスアライメントのアルゴリズムである BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて算出可能である。

【0034】

(成長因子受容体アゴニストペプチド部)

CB-GF を構成する GF 部は、コラーゲン基材のコラーゲン線維に結合して成長因子などの機能を発揮する部位である。成長因子としては、上皮成長因子 (EGF)、神経成長因子 (NGF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子ベータ (T

10

20

30

40

50

G F -)、インスリン様成長因子1 (I G F - 1)、骨形成タンパク質 (B M P) などが、このような作用を発揮しうる成長因子受容体アゴニストを広く使用することができる。その他、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、血管内皮成長因子 (V E G F) などの因子は、神経修復作用を示し、欠損部に適用すると神経再生を促進する。

【 0 0 3 5 】

このような成長因子受容体アゴニストの構造遺伝子として、特に、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F) を使用することが好ましい。このような塩基性線維芽細胞増殖因子としては、配列番号2に示す *Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic)* 遺伝子 (N C B I Reference Sequence アクセション番号 *NM_002006.4*) の468番目~935番目の塩基配列からなるDNA断片がある。また、上皮成長因子の構造遺伝子として、*Rattus norvegicus* の *preproEGF* (GenBank アクセス番号 *U04842*) のcDNAもある。

10

【 0 0 3 6 】

本発明では、GF部として、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F) を好適に使用することができる。塩基性線維芽細胞増殖因子は神経再生能に優れており、CB-GFを構成する成長因子として塩基性線維芽細胞増殖因子が結合したもの (以下、「CB-bFGF」と称する。) をコラーゲン基材に結合すると、早期に神経を修復できるからである。なお、塩基性線維芽細胞増殖因子に代えて上皮成長因子 (E G F) を結合したCB-GFをCB-EGFと称する。

20

【 0 0 3 7 】

上記のCB-bFGFの一実施形態としては、前記CBが以下の(a)~(c)からなる群から選ばれるポリペプチドであり、前記bFGFが以下の(d)~(f)からなる群から選ばれるポリペプチドであるものが例示できる。

(a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列の255番目~375番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号5で表されるアミノ酸配列の255番目~375番目のアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、コラーゲン基材のコラーゲン線維に成長因子を保持しうる程度の結合性を有するポリペプチド

30

(c) 配列番号5で表されるアミノ酸配列の255番目~375番目のアミノ酸配列との配列同一性が80%以上であるアミノ酸配列を有し、コラーゲン基材のコラーゲン線維に成長因子を保持しうる程度の結合性を有するポリペプチド

(d) 配列番号5で表されるアミノ酸配列の3番目~157番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(e) 配列番号5で表されるアミノ酸配列の3番目~157のアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、神経修復作用を有するポリペプチド

(f) 配列番号5で表されるアミノ酸配列の3番目~157のアミノ酸配列との配列同一性が80%以上であるアミノ酸配列を有し、神経修復作用を有するポリペプチド

40

【 0 0 3 8 】

(b)、(e) のアミノ酸配列において、「1~数個」の塩基とは、例えば、1~30個、1~20個、1~10個、1~5個、又は1~3個であってもよい。

(c)、(f) のアミノ酸配列において、アミノ酸配列との配列同一性は、80%以上100%未満であり、例えば、85%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上であってもよい。

アミノ酸配列同士の配列同一性は、公知のシーケンスアライメントのアルゴリズムであるBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて算出可能である。

【 0 0 3 9 】

50

(リンカー部)

CB-GFは、CB部とGF部とをリンカー部によって連結するものであってもよい。リンカー部を挿入することでCB部とGF部とを所定間隔に隔離することにより、各部位の機能を独立して十分に発揮させることができる。この結果、リンカー部を挿入することでリンカー部を有しないCB-GFを使用する場合よりも強くコラーゲン線維に結合させることができる。

このようなリンカー部としては、セリン、スレオニン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン等のアミノ酸からなる特定の三次元構造を持たないペプチド断片が例示できる。また、このようなリンカー部として、前記ColHに由来するアミノ酸配列を好適に使用することができる。より具体的には、ColHの多発性嚢胞腎I (Polycystic kidney disease I; 以下、「PKD」と称する。)ドメインを好適に使用することができる。その他、他の細菌コラゲナーゼに由来するPKDもリンカー部として好適に使用することができる。PKDの共存によりCBDのコラーゲン結合性が強化されるからである。このような細菌コラゲナーゼに由来するリンカー部は、図8のPKDとして記載されている。なお、このようなリンカー部は、生体循環液に含まれるペプチド水解酵素などに対する抵抗性を有することが好ましく、これによってGF部の局所残存性を高め、継続的な神経再生を可能とすることができる。

10

【0040】

神経再生用移植材料の製造方法

本発明の神経再生用移植材料の製造方法は、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子(CB-GF)を含有する溶液に浸漬させて、前記コラーゲんに前記コラーゲン結合部位含有成長因子を結合させる工程を有する。

20

例えば、リン酸緩衝液に配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材とCB-GFとを所定量添加し、温度0~10で60秒から60分、好ましくは5から30分、より好ましくは15から30分攪拌し、または静置することでコラーゲン基材にCB-GFを結合することができる。

【0041】

本発明で使用され得るCB-GFを構成するGF部とCB部とは、共にペプチドであるため融合タンパクとして調製することができる。CB-GFとして、成長因子受容体アゴニストが塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)であり、リンカー部およびCB部がColHに由来するPKD-CBDである場合のCB-GFをbFGF-PKD-CBDと称すれば、bFGF-PKD-CBDの製造方法は、文献(Nishi N. et al.: Proc Natl Acad Sci USA vol. 95, pages 7018 - 7023, 1998)に開示されている。これにより、bFGF-PKD-CBDを製造することができる。また、GF部として塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を使用し、CB部としてColGに由来するCBDを使用することで、これらが融合したbFGF-CBDを製造することもできる。また、bFGFの遺伝子配列に代えて上皮細胞成長因子(EGF)の遺伝子配列を使用することで、上記と同様にしてCB-EGFを製造することができる。更に、他の成長因子受容体アゴニストをコードする遺伝子配列を使用することで、CBに他の成長因子受容体アゴニストが結合したCB-GFを製造することができる。なお、前記したように架橋剤によってCB部とGF部とを架橋結合させてもよい。

30

40

【0042】

神経再生用移植材料製造用キット

本発明の神経再生用移植材料製造用キットは、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材、及び受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子(CB-GF)を備える。

【0043】

神経再生用移植材料としては、上述の神経再生用移植材料において説明したものが例示できる。前記CB-GFは、CB-GFを含むCB-GF溶液の形態であってもよい

50

。CB-GF溶液としては、CB-GFを緩衝液中に0.5~2.0mg/mlの範囲で溶解した溶液を例示できる。

緩衝液としては、pH7.0~8.0のリン酸緩衝液や、トリス緩衝液、生理食塩液を例示することができる。本発明のキットでは、成長因子アンカーリング型神経再生用移植材料の製造に必要なものがセットされているため、移植時にコラーゲン基材にCB-GF溶液を加えるだけで簡便に成長因子アンカーリング型神経再生用移植材料を調製することができる。

【0044】

神経再生方法など

上述の神経再生用移植材料において説明した本発明の神経再生用移植材料は、神経再生のために使用可能である。また、当該神経再生用移植材料を治療対象部位に移植することは、神経再生方法として実施することができる。

10

【0045】

一実施形態において本発明は、神経再生のための、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備する移植材料を提供する。

一実施形態において本発明は、神経再生のための、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備する移植材料の使用を提供する。

一実施形態において本発明は、治療を必要とする患者又は畜患に、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備する移植材料を移植することを含む、神経再生方法を提供する。

20

【0046】

移植の例としては、神経欠損部位を補填する、神経欠損部位を架橋する、神経欠損部位を被覆する、神経損傷部位を補填する、神経損傷部位を架橋する、神経損傷部位を被覆する等の方法が挙げられる。例えば、神経欠損領域長とほぼ等しい長さを有する神経再生用移植材料を、患者又は畜患の神経欠損部位へ移植することが挙げられる。

適用される神経の種類は特に制限されず、中枢神経、末梢神経、運動神経、知覚神経等のいずれに対しても適用可能である。

【0047】

神経再生とは、細胞の増加、分化、成熟等の神経の修復又は神経の発生過程で生じる様々な現象のうち少なくとも一つを示していればよい。また、その結果として、神経再生とは、本来の神経の機能が完全又は部分的に回復する現象を含むことが好ましい。

30

効率的な神経再生が達成されたかどうかは、公知の方法により確認可能である。例えば、神経損傷があり移植材料が移植された患者又は畜患と、神経損傷があり移植材料が移植されていない患者又は畜患とを比較して、移植材料が移植された患者又は畜患のほうで、損傷した神経の機能の回復の程度が高い場合、効率的な神経再生が達成されたと判断できる。神経の機能の回復は、後述の実施例に示すように、刺激への反応や運動機能の回復を指標に評価できる。

【0048】

神経再生は、欠損が生じた神経由来の細胞であって、治療対象部位にもともと存在する細胞（内在性の細胞）によるものであってもよいし、例えば神経再生用移植材料とともに移植された細胞（外来性の細胞）によるものであってもよい。これらの細胞としては、神経細胞、神経前駆細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、造血幹細胞等を挙げることができる。

40

【実施例】

【0049】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0050】

[配向性コラーゲンチューブの製造]

先ず、特許文献4に開示の方法に沿って、配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン

50

基材からなり、以下に示す特性を有する配向性コラーゲンチューブAを製造した。

【0051】

原材料コラーゲン：Porcine Skin Collagen type-I（製造元：nippi、仕様：Pepsin solubilized, 10mg/mL, 20mM acetic acid, 0.8µm filtered）

コラーゲン基材形状：筒体形状、7層重ね、筒内シームレス、

コラーゲン基材厚み：約15µm（1層分、乾燥状態）、約105µm（7層分、乾燥状態）

内径：1mm、

コラーゲン配向性：長軸方向（1～7層）、

コラーゲン量（7層分、乾燥状態）：約25mg/cm²

10

【0052】

コラーゲンチューブAの具体的な製造方法は以下のとおりである。

まず、ストリング形状の配向性コラーゲンゲルを準備した。コラーゲンゲルは濃度10mg/mLの豚皮由来I型コラーゲン溶液（nippi社製）を、内径0.38mmのノズルを介して38℃、pH7.4、10倍濃度のリン酸緩衝生理食塩液（10×PBS）が入った皿容器に押し出しながら、ノズルをスライドすることにより、直径1mm程度、長さ200mm程度のストリング形状のコラーゲンゲルを得た。

得られたコラーゲンゲルの配向性については、ラマン分光顕微鏡（フォトンデザイン社）により解析した。その際、連続発振アルゴンイオンレーザー Stabilite 2017（スペクトラフィジックス社）により励起波長を514.5nmとし、分光器はHR-320（Jovin Yvon社）、検出器はLN/CCD-1100-PB/UV AR/1（Roper scientific社）を用いた。解析により、コラーゲンゲル長軸方向にコラーゲン線維が配向していることがわかった。

20

作製したストリング形状の配向性コラーゲンゲルを、心棒上に軸方向に配列させ、その後乾燥させることによってチューブ形状の乾燥配向性コラーゲン材料を得た。さらに、チューブ形状の乾燥配向性コラーゲン材料上に、作製したストリング形状の配向性コラーゲンゲルを配列させることを繰り返し、7層とした。その後、心棒を取り除き、乾燥状態の配向性コラーゲンチューブAを得た（図1）。

【0053】

上記コラーゲンチューブAは7層のコラーゲン基材を有するものであった。コラーゲン基材を3層とし、それ以外の条件は同様にして、3層のコラーゲン基材を有するコラーゲンチューブA'を製造した。コラーゲンチューブA'は以下に示す特性を有する。

30

【0054】

コラーゲン基材形状：筒体形状、3層重ね、筒内シームレス、

コラーゲン基材厚み：約15µm（1層分、乾燥状態）、約45µm（3層分、乾燥状態）、

コラーゲン量（3層分、乾燥状態）：約11mg/cm²

（原材料コラーゲン、内径、コラーゲン配向性（1～3層）は、上記コラーゲンチューブAと同じである。）

【0055】

[bFGF-PKD-CBD融合タンパク質の製造]

40

国際公開2012/157339号に開示の方法に沿って、bFGF-PKD-CBD融合タンパク質を製造した。

bFGF-PKD-CBD融合タンパク質の具体的な製造方法は以下のとおりである。

【0056】

まず、配列番号1に示すCo1H遺伝子の2719番目～3391番目の塩基配列を含むDNA断片（PKD-CBD遺伝子）を、pGEX-4T-2プラスミド（GEヘルスケア・ジャパン社製）のSmaI部位に、常法を用いて挿入した。他方、配列番号2に示すHomo sapiens fibroblast growth factor 2（basic）遺伝子（NCBI Reference Sequenceアクセッション番号NM_002006.4）の468番目～932番目の塩基配列からなるDNA断

50

片 (b F G F 遺伝子) を、 5 ´ 末端側に B g l I I 部位を有し、 3 ´ 末端側に 1 ヌクレオチド (塩基 G) および E c o R I 部位を有するように、 P C R 法により増幅した。増幅した D N A 断片 (b F G F 遺伝子) を、前記 D N A 断片 (P K D - C B D 遺伝子) を挿入した前記プラスミドの B a m H I - E c o R I 部位に、常法を用いて挿入し、発現プラスミドを調製した。前記発現プラスミドは、 G S T - b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質 (配列番号 3) をコードするリーディングフレーム (配列番号 4) を有している。前記 b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 5 に示し、前記 b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質をコードする塩基配列を配列番号 6 に示す。配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、 N 末端の 2 つのアミノ酸残基 G l y - S e r は、 G S T タグ切断用酵素 (トロンピンプロテアーゼ) の認識部位の一部である。エレクトロポレーション法を用いて、前記発現プラスミドを、大腸菌 B L 2 1 C o d o n P l u s R I L (S t r a t a g e n e 社製) に導入し、形質転換体を作製した。

10

【 0 0 5 7 】

前記形質転換体を、 5 0 m L の 5 0 µ g / m L アンピシリン及び 3 0 µ g / m L クロラムフェニコール含有 2 × Y T - G 培地中で、一晚、前培養した。得られた前培養液 1 0 m L を前記培地 5 0 0 m L に加え、この菌液の濁度 (O . D . 6 0 0) が約 0 . 7 になるまで、 3 7 °C で振とう培養した。得られた菌液に、 0 . 1 M イソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) 溶液 5 m L を添加し、 2 5 °C で 5 時間培養した。さらに、 0 . 1 M フェニルメチルスルホニルフロリド (P M S F) 2 - プロパノール溶液 5 m L を添加後、前記菌液を 6 0 0 0 × g、 4 °C で 1 0 分間遠心し、形質転換体を回収した。 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5)、 0 . 5 M N a C l、 1 m M P M S F 7 . 5 m L に、前記形質転換体を懸濁し、フレンチ・プレスにより細胞を破壊した。この懸濁液 1 9 容量に対して、 2 0 % T r i t o n (登録商標) X - 1 0 0 1 容量を加え、 4 °C で 3 0 分間攪拌した。得られた菌液を、 1 5 , 0 0 0 × g、 4 °C で 3 0 分間遠心し、上清を回収した。この上清を、さらに 1 5 , 0 0 0 × g、 4 °C で 3 0 分間遠心し、上清を回収した。この上清を、清澄溶菌液とした。グルタチオン - セファロースビーズ 2 m L に前記清澄溶菌液を添加し、 4 °C で 1 時間攪拌した。前記ビーズを、 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5)、 0 . 5 M N a C l 1 2 m L を用いて 5 回洗浄後、少量の 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5)、 0 . 5 M N a C l に懸濁してカラムに充填し、溶出液 (5 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0)、 0 . 5 M N a C l、 1 0 m M グルタチオン) を用いて、前記 G S T - b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質を溶出した。この融合タンパク質 1 m g あたり、 5 u n i t の トロンピンを添加して、 2 5 °C で 1 0 時間反応させた。得られた反応液を、ヘパリン - セファロースビーズ 1 m L に添加し、 4 °C で 3 時間攪拌して b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質を本ビーズに結合させた。上清を静かに捨て 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5)、 0 . 5 M N a C l 1 2 m L を用いて 3 回洗浄した。このビーズをカラムに充填し、 0 . 5 ~ 2 M N a C l の塩勾配を含む 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5) 計 1 0 m L を用いてタンパク質を溶出し、 b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質 (配列番号 5) を得た。

20

30

【 0 0 5 8 】**[移植試験 1 - 1]**

生後 7 週齢の Wistar ラットの坐骨神経を 5 m m 欠損させた。欠損部に長さ 5 m m の配向性コラーゲンチューブ A を移植し、架橋した。移植から 1 2 週経過後の移植部位の様子を図 2 に示す。配向性コラーゲンチューブ A 内に神経再生が認められた (図 2) 。

40

【 0 0 5 9 】

ラットに逆行性神経トレーサー (F a s t B l u e) を投与し、神経再生後の L 5 後根神経節細胞を観察した。結果を図 3 に示す。 F a s t B l u e で標識された L 5 後根神経節細胞が観察され (図中矢印)、再生後の神経が機能的であることが示された。

【 0 0 6 0 】**[移植試験 1 - 2]**

コラーゲンチューブ A の代わりに上記コラーゲンチューブ A ´ を用いて移植を行った以

50

外は、上記 [移植試験 1 - 1] と同様にして、移植試験を行った。

コラーゲンチューブ A' を用いた場合、移植作業中にコラーゲンチューブのコラーゲン基材が裂けてしまう場合があった。移植後、コラーゲンチューブ A' 内の神経再生は認められた。

したがって、コラーゲンチューブ A は、移植作業効率及び神経再生の効率化の点で、コラーゲンチューブ A' よりも優れていた。

【0061】

[移植試験 2]

まず、上述のようにして、前記配向性コラーゲンチューブ A を製造した。

生後 7 週齢の Wistar ラット 16 匹を実験に供した。通常自然治癒が認められない程度の欠損である坐骨神経 15 mm 欠損作製した群 (欠損群)、配向性コラーゲンチューブ A をリン酸緩衝液に浸漬後、坐骨神経 15 mm 欠損部に移植し、欠損部を長さ 15 mm のコラーゲンチューブで架橋した群 (PBS 群) (n = 8)。移植後、1, 4, 8 週でラット歩行解析装置 (CatWalk) を用いて足底のプリント幅、プリント長を測定した。欠損前の値を 1 とし、評価結果を図 4 に示す。

10

【0062】

図 4 を参照すると、プリント幅は欠損群に比べ、PBS 群では有意にプリント幅が広がった。また、プリント長も欠損群に比べ PBS 群で有意に高く、欠損前と同等のプリント長を示した。

これらの結果から、PBS 群では欠損群に比べて、運動機能の回復の程度が、優れていることが明らかとなった。このことから、配向性コラーゲンチューブ A が非常に優れた神経再生効果を有することが明らかとなった。

20

【0063】

[成長因子アンカーリング型配向性コラーゲンチューブの製造・CB - GF 結合試験]

リン酸緩衝液中に bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質をそれぞれ 1.25 mg/ml、2.5 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml の濃度で溶解した溶液を用意し、上記の配向性コラーゲンチューブを溶液中に添加した。

配向性コラーゲンチューブへの bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質の結合量は、溶液中上清中の bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質量から、以下のように求めた。

結合量 = 添加量 - 溶液上清中の bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質量

30

【0064】

結合試験の結果を図 5 に示す。図 5 のグラフは、bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質の添加量と、配向性コラーゲンチューブへの bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質の結合量の関係を示している。10 µg の bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質を添加した場合、そのうちの約 9 µg が結合していた。図 5 のグラフから、他の添加量の場合でも約 90% のタンパク質結合率を達成できたことが読み取れる。以上のことから、bFGF - PKD - CBD 融合タンパク質を配向性コラーゲンチューブに bFGF を高効率でアンカーリングさせ、成長因子アンカーリング型配向性コラーゲンチューブが得られたことが示された。

40

【0065】

[移植試験 3]

まず、上述のようにして、前記配向性コラーゲンチューブ A を bFGF - PKD - CBD 溶液 10 mg/ml に浸漬させ、成長因子アンカーリング型配向性コラーゲンチューブ (配向性コラーゲンチューブ B) を製造した。

生後 7 週齢の Wistar ラット 8 匹を実験に供した。ラットは、前記配向性コラーゲンチューブ A をリン酸緩衝液に浸漬後移植した群 (PBS 群)、成長因子アンカーリング型の前記配向性コラーゲンチューブ B を移植した群 (bFGF - PKD - CBD 群) の 2 群に分けた。通常自然治癒が認められない程度の欠損である坐骨神経 15 mm 欠損を各群のラットに対して作製後、欠損部を長さ 15 mm の上記の各コラーゲンチューブでそれぞれ架橋した。

50

【 0 0 6 6 】

移植から2週間経過後より von Frey filamentによる行動学的評価を行い、感覚神経の回復を評価した。行動学的評価では、0.008～300gの足裏刺激に対して反応したラットの割合と、ラットが反応した閾値の平均値を求めた。評価は移植から2週間経過後、3週間経過後、4週間経過後、5週間経過後、6週間経過後の各時点で行った。評価結果を表1及び図6に示す。

【 0 0 6 7 】

【表1】

ラット 感覚神経 回復率

	移植からの経過週数				
	2週	3週	4週	5週	6週
bFGF-PKD-CBD群	4/4	4/4	4/4	2/2	2/2
PBS群	2/4	4/4	4/4	2/2	2/2

10

【 0 0 6 8 】

表1は、ラットの感覚神経の回復率（回復個体数/評価対象個体数）を示す。回復の評価は、300gの足裏刺激への反応の有無で評価した。PBS群及び、bFGF-PKD-CBD群の両群で感覚神経の回復が認められた。したがって、配向性コラーゲンチューブA、配向性コラーゲンチューブBの両チューブで、本来自然治癒が困難な程度の神経欠損を再生可能であることが示された。

20

【 0 0 6 9 】

PBS群では、移植から3週間経過時点で全例（4例中4例）感覚神経の回復が認められたのに対して、bFGF-PKD-CBD群では移植から2週間経過時点で全例感覚神経の回復を認めた。このことから、bFGF-PKD-CBD群ではPBS群に比べて、早期に感覚神経の再生が認められたことが明らかとなった。

【 0 0 7 0 】

図6を参照すると、bFGF-PKD-CBD群はPBS群に比べ低い刺激（圧）で反応していることがわかる。

また、再生した神経の様子を図7に示す。図7は、コラーゲンチューブ移植から8週間経過時点での、再生した神経のトルイジンブルー染色像である。bFGF-PKD-CBD群ではPBS群に比べて、より多くの髄鞘が形成されていた。

30

これらの結果から、bFGF-PKD-CBD群ではPBS群に比べて、再生した神経の回復の質が、機能的にも組織学的にも、より優れていることが明らかとなった。

【 0 0 7 1 】

以上で説明した各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は一例であり、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。また、本発明は各実施形態によって限定されることはなく、請求項（クレーム）の範囲によってのみ限定される。

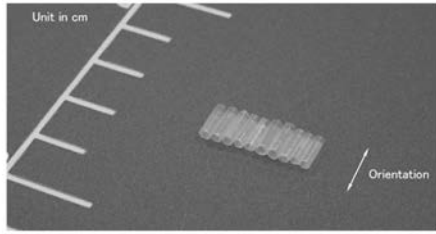
【産業上の利用可能性】

40

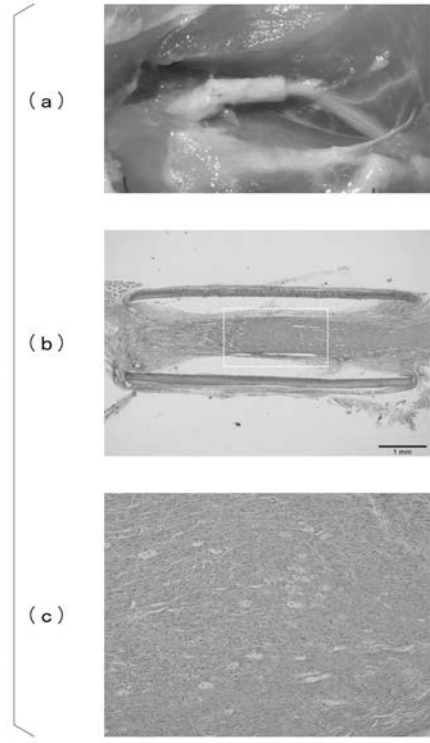
【 0 0 7 2 】

本発明によれば、効率的な神経再生を可能にする神経再生用移植材料を提供できる。

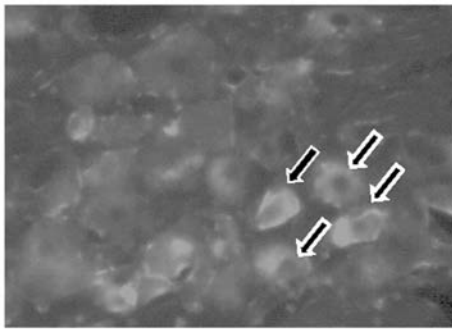
【 図 1 】



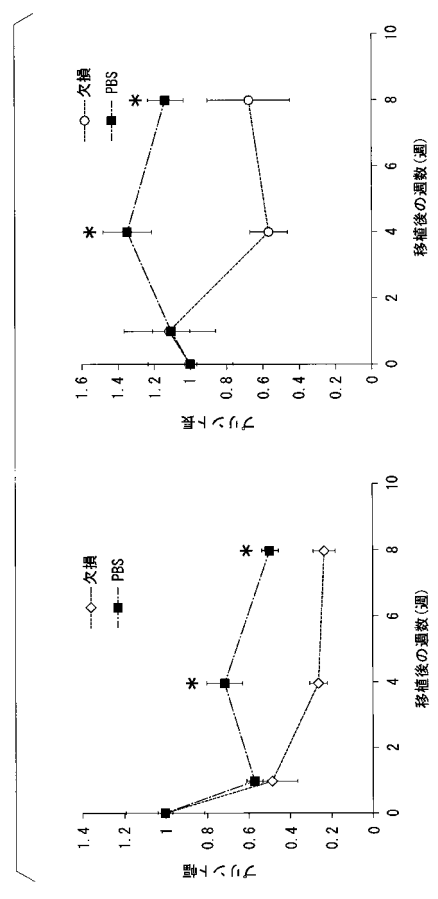
【 図 2 】



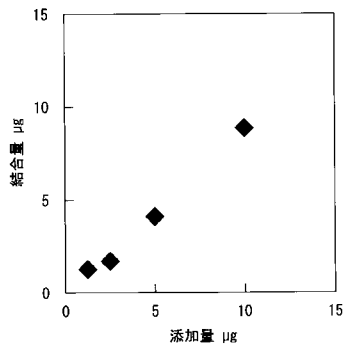
【 図 3 】



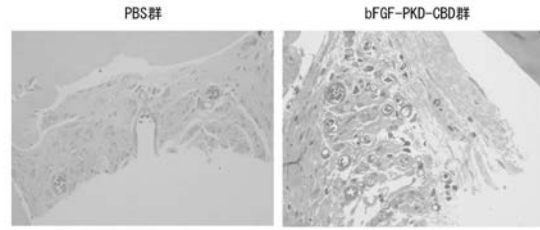
【 図 4 】



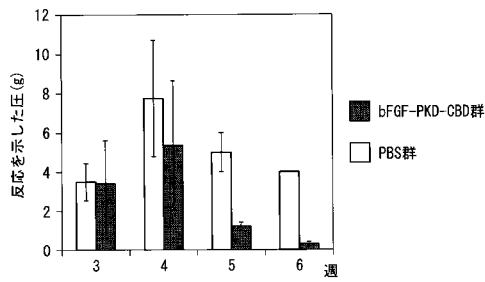
【 図 5 】



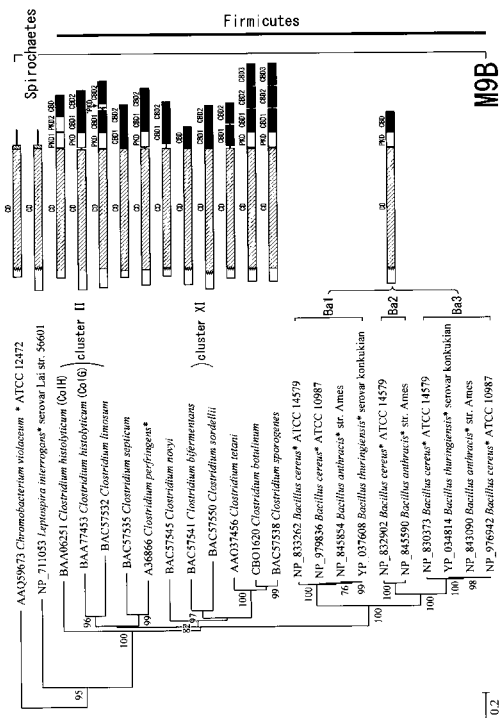
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【配列表】

2016060252000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年2月16日(2016.2.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を具備し、

前記コラーゲんに、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子が結合され、

前記コラーゲン結合部位含有成長因子は、前記成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とがリンカー部を介して結合されたものであり、

前記リンカー部が、コラゲナーゼの多発性嚢胞腎ドメインである神経再生用移植材料

。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

中空の筒体形状を有し、該筒体の内面の少なくとも一部が前記コラーゲン基材により構成された請求項1に記載の神経再生用移植材料。

【請求項4】

前記コラーゲン基材が筒体形状を有し、該コラーゲン基材は継ぎ目のないシームレスチューブである、請求項3に記載の神経再生用移植材料。

【請求項5】

前記コラーゲンが、前記筒体の両端の開口部を結ぶ方向に配向性を有する請求項3に記載の神経再生用移植材料。

【請求項6】

前記成長因子受容体アゴニストペプチド部は、塩基性線維芽細胞増殖因子である、請求項1～5のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項7】

前記コラーゲン基材は、複数のコラーゲン基材層からなる請求項1～6のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項8】

前記コラーゲン基材の厚みが、50 μ m以上、200 μ m以下である請求項1～7のいずれか一項に記載の神経再生用移植材料。

【請求項9】

配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材を、受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を含有する溶液に浸漬させて、前記コラーゲんに前記コラーゲン結合部位含有成長因子を結合させる工程を有する神経再生用移植材料の製造方法。

【請求項10】

配向性を有するコラーゲンを含むコラーゲン基材、

及び受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子、

を備えた神経再生用移植材料製造用キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/079334
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L27/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Ma, F. et al., Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor facilitate recovery of sciatic nerve injury in rats, Tissue Engineering Part A, 2014 Apr, Vol.20, No.7-8, p.1253-62 ISSN 1937-3341, Abstract, Fig.1-7	1, 2, 6, 9, 10 2-10
X Y	Cui, Y. et al., Collagen scaffolds modified with CNTF and bFGF promote facial nerve regeneration in minipigs, Biomaterials, 2014 Sep, Vol.35, No.27, p.7819-27 ISSN 0142-9612, Abstract, Fig.1-7	1, 2, 6, 9, 10 2-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 November 2015 (05.11.15)		Date of mailing of the international search report 17 November 2015 (17.11.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/079334

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Ma, F. et al., Use of natural neural scaffolds consisting of engineered vascular endothelial growth factor immobilized on ordered collagen fibers filled in a collagen tube for peripheral nerve regeneration in rats, International Journal of Molecular Science, 2014 Oct 15, Vol.15, No.10, p.18593-609 ISSN 1422-0067, Abstract, Fig.1-7,9	1,2,9,10 2-10
X Y	Cao, J. et al., Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds, Biomaterials, 2013, Vol.34, No.4, p.1302-10 ISSN 0142-9612, Abstract, Fig.1-7	1,2,9,10 2-10
X Y	WO 2014/074134 A1 (TUFTS UNIVERSITY), 15 May 2014 (15.05.2014), claims; page 9, line 6 to page 11, line 24 & WO 2013/071062 A1	1,3,4,7,8 2-4,6-10
Y	WO 2012/157339 A1 (The Kitasato Institute), 22 November 2012 (22.11.2012), claims; paragraphs [0047], [0050]; preparation examples & US 2014/0335146 A1 claims; paragraphs [0068] to [0069], [0072] to [0074]; production examples & JP 5512887 B & EP 2708246 A1	5,6
P,A	Toshiko FUJIMAKI et al., "Collagen Ketsugogata Enkisei Sen'igasaibo Zoshoku Inshi o Mochiita Jinko Shinkei ni yoru Masshoshinkei Saisei", The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, 10 September 2015 (10.09.2015), vol.89, no.8, page S1495, column 1-6-6, ISSN 0021-5325, entire text	1-10
A	Zhao, W. et al., Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors, Journal of biomedical materials research Part A, 2007, Vol.82, No.3, p.630-6, ISSN 1549-3296, page 631, item of Construction of recombinant plasmids	5-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 7 9 3 3 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	Ma, F. et al., Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor facilitate recovery of sciatic nerve injury in rats, Tissue Engineering Part A, 2014 Apr, Vol.20, No.7-8, p.1253-62 ISSN 1937-3341, Abstract, Fig.1-7 等	1, 2, 6, 9, 10 2-10									
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 05.11.2015		国際調査報告の発送日 17.11.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 基章	4U 4146								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/079334
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	Cui, Y. et al., Collagen scaffolds modified with CNTF and bFGF promote facial nerve regeneration in minipigs, Biomaterials, 2014 Sep, Vol.35, No.27, p.7819-27 ISSN 0142-9612, Abstract、Fig.1-7 等	1, 2, 6, 9, 10 2-10
X Y	Ma, F. et al., Use of natural neural scaffolds consisting of engineered vascular endothelial growth factor immobilized on ordered collagen fibers filled in a collagen tube for peripheral nerve regeneration in rats, International Journal of Molecular Science, 2014 Oct 15, Vol.15, No.10, p.18593-609 ISSN 1422-0067, Abstract、Fig.1-7,9 等	1, 2, 9, 10 2-10
X Y	Cao, J. et al., Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds, Biomaterials, 2013, Vol.34, No.4, p.1302-10 ISSN 0142-9612, Abstract、Fig.1-7 等	1, 2, 9, 10 2-10
X Y	WO 2014/074134 A1 (TUFTS UNIVERSITY) 2014.05.15, Claims、第9頁第6-第11頁第24行目等 & WO 2013/071062 A1	1, 3, 4, 7, 8 2-4, 6-10
Y	WO 2012/157339 A1 (学校法人北里研究所) 2012.11.22, 請求項、[0047]、[0050]、製造例等 & US 2014/0335146 A1, Claims, [0068]-[0069], [0072]-[0074], Production Examples, et al. & JP 5512887 B & EP 2708246 A1	5, 6
P, A	藤巻寿子 ほか, コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた人工神経による末梢神経再生, 日整会誌, 2015.09.10, 第89巻, 第8号, p.S1495, 1-6-6欄, ISSN 0021-5325, 全文	1-10
A	Zhao, W. et al., Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors, Journal of biomedical materials research Part A, 2007, Vol.82, No.3, p.630-6, ISSN 1549-3296, 第631頁 Construction of recombinant plasmids の項	5-8

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71) 出願人 000135151

株式会社ニッピ

東京都足立区千住緑町 1 丁目 1 番 1 号

(74) 代理人 100106909

弁理士 棚井 澄雄

(74) 代理人 100188558

弁理士 飯田 雅人

(72) 発明者 内田 健太郎

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 1 5 番 1 号 学校法人北里研究所内

(72) 発明者 井上 玄

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 1 5 番 1 号 学校法人北里研究所内

(72) 発明者 藤巻 寿子

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 1 5 番 1 号 学校法人北里研究所内

(72) 発明者 高相 晶士

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 1 5 番 1 号 学校法人北里研究所内

(72) 発明者 佐久 太郎

東京都渋谷区広尾一丁目 1 2 番 1 6 号 ハナサキビル 株式会社アトリー内

(72) 発明者 磯部 仁博

東京都渋谷区広尾一丁目 1 2 番 1 6 号 ハナサキビル 株式会社アトリー内

(72) 発明者 松下 治

岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内

(72) 発明者 美間 健彦

岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内

(72) 発明者 西 望

香川県木田郡三木町池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内

(72) 発明者 服部 俊治

茨城県取手市桑原 5 2 0 - 1 1 株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所内

(72) 発明者 田中 啓友

茨城県取手市桑原 5 2 0 - 1 1 株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所内

(72) 発明者 小倉 孝之

茨城県取手市桑原 5 2 0 - 1 1 株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所内

F ターム(参考) 4C081 AB18 BA12 CD121 CE02 DA03

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。