

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2010/024432 A1

(43) 国際公開日

2010年3月4日(04.03.2010)

PCT

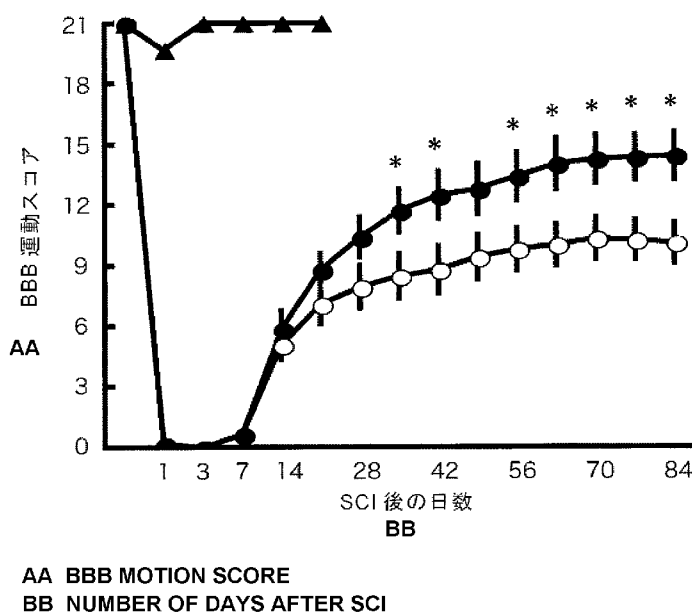
- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/065161
- (22) 国際出願日: 2009年8月31日(31.08.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-222977 2008年9月1日(01.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 国立大学法人千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山下 俊英 (YAMASHITA, Toshihide) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 甲田 将章 (KOHTA, Masaaki) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 S K 飯田橋ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR CENTRAL NERVOUS SYSTEM INJURY

(54) 発明の名称: 中枢神経損傷治療剤

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a therapeutic agent for central nervous system injury, which can treat central nervous system injury effectively. The therapeutic agent for central nervous system injury comprises a TGF- β 1 inhibitor such as an anti-TGF- β 1 antibody as an active ingredient. The therapeutic agent for central nervous system injury can treat central nervous system injury effectively. The therapeutic agent can significantly improve a motor function that has been lost by mechanical contusion of the spinal cord. Therefore, it is believed that the therapeutic agent can greatly contribute to the treatment of central nervous system injury caused by an accident or a disease.

(57) 要約: 中枢神経の損傷を効果的に治療することができる、中枢神経損傷治療剤が開示されている。中枢神経損傷治療剤は、抗 TGF- β 1 抗体のような TGF- β 1 阻害剤を有効成分として含有する。中枢神経損傷治療剤は、中枢神経の損傷を効果的に治療することができる。本発明の治療剤によれば、脊髄の機械的な挫傷により失われた運動機能が、有意に改善する。従って、本発明の治療剤は、事故や疾病による中枢神経の損傷の治療に大いに寄与するものと考えられる。

する。従って、本発明の治療剤は、事故や疾病による中枢神経の損傷の治療に大いに寄与するものと考えられる。

WO 2010/024432 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 中枢神経損傷治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、中枢神経損傷治療剤に関する。

背景技術

[0002] 脊髄の傷害により、ニューロン及びグリアの双方に損傷を与える、一連の細胞性及び生化学的プロセスが開始される。損傷部位において細胞及び軸索の消滅が起き、この障害が隣接領域に広がっていく。脊髄軸索は自発的に再生しないので、内発性の神経解剖学的修復及び機能回復を促進する戦略が必要である。免疫細胞の活性化及び炎症プロセスが、損傷後の続発症において重要な役割を果たすと信じられている。いくつかの炎症プロセスは、中枢神経系の修復を促進するので、有益であるという数種類の知見がある。活性化マクロファージを脊髄内移植することにより解剖学的及び機能的修復が改善されたことが報告されている（非特許文献1）。このことは、いくつかの活性化炎症細胞が、損傷された中枢神経系(CNS)にとって有益であるかもしれないことを示唆している。活性化マクロファージの投与は、損傷部位から破片を清掃し、種々のサイトカインを生産することにより軸索の成長を促進すると報告されている。炎症により誘導されるサイトカイン及び局所的に放出される成長因子が、CNS炎症におけるこれらの2つの作用に寄与しているかもしれない。対照的に、CNSの損傷後、免疫応答を過度に増強することはニューロンに有害である。従って、免疫系は、CNSの損傷後の防御及び維持において役割を果たしているかもしれず、免疫応答は、よく制御されるならば、ニューロンに有益かもしれない（非特許文献2）。

[0003] TGF- β 1は、創傷修復に密接に関与する多面的なサイトカインである。TGF- β 1は数種類のCNS病理モデルにおいて発現し、神経変性プロセスにおけるその重要な役割は認められつつある（非特許文献3）。TGF- β 1は、単球及びリンパ球の活性を刺激することにより炎症応答を高める。TGF- β 1は、哺乳動物

における組織損傷に応答してアップレギュレートされる。このアイソフォームは、組織修復において最も一般的に関与している。TGF- β 1は、新たなマトリックスタンパク質（コラーゲン、フィブロネクチン及びプロテオグリカン）の生産を同時に刺激することにより細胞外マトリックスの沈着を誘導し、炎症応答に関与する。

- [0004] 成熟哺乳動物のCNSでは、損傷した軸索の再生能力は極めて限られているということは既によく確立されている。適切な軸索再生がないので、成体の脳及び脊髄への外傷による損傷は、しばしば終身的な神経欠損を引き起こす。CNS損傷後、損傷部位の周囲には、種々の神経突起成長阻害物質が存在する。これらは、損傷により誘導される乏しい軸索再生及び機能欠損の少なくとも部分的な原因であると考えられている。ミエリン中の軸索成長阻害物質は重要な役割を果たすと考えられているが、CNSの損傷部位の周囲に発生するグリア性瘢痕中に発現する、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPGs)のような細胞外マトリックス分子は、顕著な阻害剤である。TGF- β 1の投与により、グリア性瘢痕が増加し（非特許文献4、非特許文献5）、グリア性瘢痕は軸索再生に対する物理的及び化学的障壁を作り出す（非特許文献6、非特許文献7）。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特表2002-518464号公報
特許文献2：特表平9-510967号公報
特許文献3：国際公開公報W093/019783
- [0006] 非特許文献1：Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. Nat Med 4: 814-821.
非特許文献2：Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary deg

eneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5: 49–55.

非特許文献3: Finch CE, Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM (1993) TGF- β 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem* 53: 314–322.

非特許文献4: Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Rozovsky I, Young-Chan CS, Zarow C, Finch CE (1994) Transforming growth factor- β 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin α 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin. *Neuroscience* 58: 563–572.

非特許文献5: Morgan TE, Laping NJ, Rozovsky I, Oda T, Hogan TH, Finch CE, Pasinetti GM (1995) Clusterin expression by astrocytes is influenced by transforming growth factor β 1 and heterotypic cell interactions. *J Neuroimmunol* 58: 101–110.

非特許文献6: Qiu J, Cai D, Filbin MT (2000) Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia* 29: 166–174.

非特許文献7: Yiu G, He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7: 617–627.

非特許文献8: Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12: 1–21

非特許文献9: Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F (2005) Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* 32: 105–111

非特許文献10: Tang X, Davies JE, Davies SJ (2003) Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res* 71: 427–444

非特許文献11: Pratt BM, McPherson JM (1997) TGF- β in the central n

ervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. Cytokine Growth Factor Rev 8: 267-292.

非特許文献12: Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature 389: 990-994.

非特許文献13: Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. EMBO J 18: 578-585.

非特許文献14: Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. Nat Neurosci 7: 269-277.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記の通り、損傷された中枢神経の再生を促進する方法も提案されているが、その効果は必ずしも十分ではなく、中枢神経損傷の実用的な治療方法は未だ存在しない。

[0008] 従って、本発明の目的は、中枢神経の損傷を効果的に治療することができる、中枢神経損傷治療剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、TGF- β 1の阻害剤を中枢神経の損傷部位に投与することにより、損傷部位における軸索の伸長が促進され、運動機能の回復が促進されることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、次の通りである。

- (1) TGF- β 1阻害剤を有効成分として含有する中枢神経損傷治療剤。
- (2) 前記TGF- β 1阻害剤が、抗TGF- β 1抗体又はその抗原結合性断片である上記(1)記載の治療剤。

- (3) 前記TGF- β 1阻害剤が、抗TGF- β 1中和抗体である上記(1)又は(2)記載の治療剤。
- (4) 前記中枢神経が脊髄である上記(1)ないし(3)のいずれかに記載の治療剤。
- (5) 抗TGF- β 1中和抗体を有効成分として含有する脊髄損傷治療剤。
- (6) 軸索の成長促進剤及び／又は軸索の保存剤である(1)ないし(5)のいずれかに記載の治療剤。
- (7) 前記軸索が、セロトニン作動性軸索である(6)記載の治療剤。
- (8) TGF- β 1阻害剤の、中枢神経損傷治療剤の製造のための使用。
- (9) 抗TGF- β 1中和抗体の、脊髄損傷治療剤の製造のための使用。
- (10) 前記中枢神経損傷治療剤が、軸索の成長促進及び／又は保存剤である(8)又は(9)記載の治療剤。
- (11) 前記軸索が、セロトニン作動性軸索である(10)記載の治療剤。
- (12) 治療に有効な量のTGF- β 1阻害剤を、中枢神経の損傷部位に投与することを含む、損傷した中枢神経の治療方法。
- (13) 軸索の成長促進及び／又は保存方法である(12)記載の方法。
- (14) 前記軸索が、セロトニン作動性軸索である(13)記載の方法。

発明の効果

[0011] 本発明により、中枢神経の損傷を効果的に治療することができる、中枢神経損傷治療剤が提供された。下記実施例において具体的に記載するように、本発明の治療剤によれば、脊髄の機械的な挫傷により失われた運動機能が、有意に改善する。従って、本発明の治療剤は、事故や疾病による中枢神経の損傷の治療に大いに寄与するものと考えられる。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 上記の通り、本発明の中枢神経損傷治療剤は、TGF- β 1阻害剤を有効成分として含有する。TGF- β は、細胞増殖・分化を制御し、細胞死を促すことが知られているサイトカインであり、TGF- β 1はTGF- β ファミリーに包含される1つのアイソフォームである。TGF- β 1自体は周知であり、よく研究されている

。

[0013] 本発明において用いられるTGF- β 1阻害剤とは、TGF- β 1の作用を阻害（喪失又は低減）させる物質を意味し、好ましい例として抗TGF- β 1抗体を挙げることができる。TGF- β 1の作用を阻害（中和）する抗TGF- β 1抗体は、TGF- β 1の研究用として広く用いられており、市販されている。本発明においてはこのような市販の抗TGF- β 1抗体を好ましく用いることができる。TGF- β 1の作用は、TGF- β 1受容体と結合することにより発揮されることが知られており、市販の抗TGF- β 1抗体は、TGF- β 1とTGF- β 1受容体との結合を阻害することが確認されている。また、TGF- β 1と抗原抗体反応により結合してその作用を阻害する抗体であれば、必ずしもTGF- β 1を免疫原として作製された抗体でなくともよく、交差反応的にTGF- β 1と抗原抗体反応してその作用を阻害する抗体であってもよい。もっとも、投与対象となる動物が持っている天然のTGF- β 1を対応抗原とする抗体が好ましく、従って、治療対象がヒトであれば、ヒトのTGF- β 1を対応抗原とする抗体が好ましい。

[0014] 一般に、抗体の抗原結合性断片、すなわち、抗体の可変領域を含むFab断片やF(ab')₂断片等は、抗体の対応抗原に結合し、抗体と同様な作用を発揮することが多いことも知られている。従って、本発明においては、TGF- β 1の作用を阻害する抗体の抗原結合性断片を有効成分として用いることもできる。また、抗体医薬としては、投与された抗体医薬を異物として認識する免疫応答をできるだけ抑制するために、定常領域をその動物の定常領域に変えたキメラ抗体（ヒトに投与する抗体医薬であれば、ヒトの定常領域を持つ）抗体や、さらにはCDR領域もヒト由来領域に変えたヒト化抗体、ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物に抗原を免疫して作成したヒト抗体も抗体医薬として広く用いられており、このようなキメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体も好ましく用いることができる。これらの抗体の作製技術は既に抗体医薬の分野において確立されている。さらに、遺伝子工学的に生産された抗体でもよい。さらに、ScFvのような一本鎖抗体も抗原結合性断片に含めて解釈する。また、抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。

- [0015] 本発明において用いられるTGF- β 1阻害剤は、抗TGF- β 1抗体又はその抗原結合性断片が代表的であるが、TGF- β 1は、TGF- β 1受容体に結合することによりその生理活性を発揮することが知られているので、TGF- β 1とTGF- β 1受容体との結合を阻害すればTGF- β 1の作用を阻害することができる。本発明において、「TGF- β 1阻害剤」としては、TGF- β 1とTGF- β 1受容体との結合を阻害する物質も包含される。代表的なものとして、TGF- β 1との結合を阻害する抗TGF- β 1受容体抗体及びその抗原結合性断片を例示することができる。TGF- β 1との結合を阻害する抗TGF- β 1受容体抗体も市販されており、このような市販品を好ましく用いることができる。
- [0016] さらに、上記した抗体やその抗原結合性断片を生体内で生産させることができる、該抗体やその抗原結合性断片の遺伝子を組み込んだ組換えベクターも本発明でいう「TGF- β 1阻害剤」に包含される。抗体を遺伝子工学的に作製する技術は既に広く用いられており、抗体遺伝子を組み込んだ組換えベクターは容易に作製可能である。一方、所望のタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ組換えベクターを生体に投与し、生体内でその遺伝子を発現させることにより結果的にそのタンパク質を生体に投与する手法は、遺伝子治療、特に、遺伝子ワクチンの分野において広く知られており、本発明で用いる抗体をこのような遺伝子治療的手法により投与することも可能である。
- [0017] 本発明の治療剤による治療対象は、中枢神経の損傷である。中枢神経は脊髄が好ましい。本発明の治療剤は、中枢神経、好ましくは脊髄を構成する神経の軸索の成長を促進し及び／又は保存する。特に、下記実施例に具体的に示されるように、セロトニン作動性軸索の成長を促進し及び／又は保存にも有効である。また、本発明の治療剤により治療可能な損傷は、交通事故、スポーツ事故、転倒等の事故による外傷の他、脊髄腫瘍やヘルニア等の疾病に起因する損傷も含まれる。好ましくは外傷に起因する損傷である。
- [0018] 投与経路は、損傷部への局所投与が好ましい。投与は、注射により断続的に行うことも可能であるが、下記実施例に記載されるように、ミニポンプとこれに接続したカテーテル等を駆使して持続的に損傷部に投与することが好

ましい。投与は、損傷後、可能な限り速やかに開始することが好ましく、投与は損傷から少なくとも1週間、さらに好ましくは少なくとも2週間続けることが好ましい。もっとも、損傷後、長期間経過後は治療効果が低くなるので、投与は最長2ヶ月程度、さらに好ましくは最長1ヶ月程度とすることが経済面及び患者の負担の観点から好ましい。

[0019] 抗TGF- β 1抗体を用いる場合、その投与量は、損傷の程度や患者の状態等により適宜設定できるが、成人の場合、通常、1日当たり0.01mg~2000mg程度、好ましくは0.5mg~100mg程度である。また、製剤は、常法に従い、注射剤として製剤したものを用いることができ、例えば、生理食塩液中に抗体を溶解した抗体溶液等を用いることができる。注射剤には、製剤分野で常用される緩衝剤、pH調節剤、浸透圧調節剤等を添加することができる。また、本発明の効果が阻害されないならば、他の薬剤、例えば、外傷の治療や悪化防止に用いられる殺菌剤、抗生物質等や、栄養剤等を併用することも可能である。

[0020] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0021] 材料及び方法

外科的処置

麻酔（ペントバルビタールナトリウム、40mg/kg）した雌Sprague-Dawleyラット（200~250g）を脊椎レベルT9/T10で椎弓切除して脊髄を露出させた。無限水平衝撃器（infinite horizon impactor（IH impactor；Precision System Instrumentation社製）を用いて脊髄を挫傷した。動物モデルでの中和抗体アッセイのために、脊髄損傷（SCI）の直後に、対照ウサギIgG（13匹）又は抗TGF- β 1抗体（13匹）を充填した浸透ミニポンプ（200 μ L溶液、0.5 μ L/h、14日間送達、Alzet pump model 2002（商品名））を各ラットに埋め込んだ。ミニポンプは、動物の背中の皮下に置き、ミニポンプの出口に接続されたシリコーンゴムチューブをSCI部位の硬膜の下に置いた。次に、筋肉層と皮膚層を縫合

した。偽手術したラット（3匹）は、脊椎レベルT9/T10で椎弓切除して脊髄を露出させた。次に、筋肉層と皮膚層を縫合した。

[0022] 免疫組織化学

深い麻酔を誘導した後、0.1Mリン酸緩衝液(PB)中4%パラホルムアルデヒド(PFA)溶液を心臓灌流した。脊髄を切り取り、上記固定液で後固定し、30%ショ糖含有PBS中で一夜低温保存した。損傷部位より頭側10mm及び尾側10mmを、Tissue Tek OCT（商品名）に包埋した。各ブロックを横断面に沿って薄切りした(50 μ m)。矢状切片(50 μ m)を、損傷部位より頭側10mm及び尾側10mmから集めた。PBSで3回洗浄後、5%ウシ血清及び0.1% Triton X-100（商品名）を含むPBSで、室温(RT)下、1時間、全ての切片をブロックした。切片を一次抗体と4℃で一夜インキュベートし、PBSで3回洗浄し、フルオレッセイン結合二次抗体(1:1000, Invitrogen社製)と室温下、1時間インキュベートした。モノクローナル抗グリア性線維性酸性タンパク質(GFAP)抗体(1:1000, Chemicon社製)、モノクローナル抗コンドロイチン硫酸抗体(1:200, Sigma社製)、抗タイプIVコラーゲン抗体(1:200, LSL社製)、抗Iba1抗体(1:500, 和光社製)、モノクローナル抗ED1抗体(1:100, Serotec社製)及びポリクローナル抗セロトニン抗体(5HT)(1:1000, Immunostar社製)を一次抗体として用いた。

[0023] 皮質脊髄路(CST)の順行性標識

5匹の対照IgG投与SCIラット及び5匹の抗TGF- β 1抗体投与SCIラットにおいて、下行性CST線維をビオチン化デキストランアミン(BDA、食塩液中10%、皮質当り4.0 μ L、分子量10000, Invitrogen社製)で標識した。BDAは、損傷10週間後に、麻酔下、左右の運動皮質（座標：ブレグマの2mm前、ブレグマの2mm横、深さ1.5mm）に注入した。各注入では、マイクロリットルシリンジ(IT0社製)に接続された内径15~20 μ mのガラスキャピラリーを介して4 μ LのBDAを、8分間かけて注入した。BDA注入14日後、PBS、次に4%パラホルムアルデヒドを灌流することにより動物を殺した。脊髄を切り取り、上記固定液で一夜後固定し、30%ショ糖含有PBS中で一夜低温保存した。損傷部位より頭側40mm、頭側10mm及び尾側10mmの脊髄をTissue Tek OCT中に包埋した。各ブ

ロックを横断面に沿って薄切りした(50 μ m)。切片を、0.5%BSA含有PBSで1時間ブロックし、0.15%BSA含有PBS中Alexa Fluor 488-結合ストレプトアビジン(商品名、1:400, Invitrogen社製)と1時間インキュベートした。

[0024] 定量

各マーカーの免疫反応密度の定量は、顕微鏡を用いて行った。長さ10mm(GFAP、Iba1及びED1について)長さ4mm(GSPG及びコラーゲンについて)の切片中の免疫反応性を、Scion Image software(商品名、米国メリーランド州FrederickのScion Corporation社製)を用いて測定した。免疫標識した領域のピクセル数は、全領域のピクセル数に対する百分率として算出した。

[0025] 損傷部位の中心から10mm頭側の切片及び10mm尾側の切片を用いてセロトニン陽性線維を測定した。セロトニン陽性線維のピクセル数は、同じ切片中の前角のピクセル数に対する百分率として算出した。

[0026] 損傷部位から40mm頭側の横断面切片中のBDA-陽性線維のピクセル数を計数した。灰白質中のBDA-標識線維のピクセル数は、同一の切片の後柱の前角中に観察された該線維のピクセル数に対する百分率として算出した。

[0027] 神経突起成長アッセイ

出生後のラット(P7-9)からトリプシン処理(PBS中0.25%トリプシンで37°C、15分間処理)により小脳顆粒神経細胞(cerebellar granule neurons (CGNs))を切り取り、10%ウシ胎児結成を含むダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)中に再懸濁し、すりつぶし、血清含有DMEMで3回洗浄した。B27添加無血清DMEM中でニューロンを培養し、ポリ-L-リジン(PLL)でコートしたチャンバースライド(LabTek II(商品名)、デンマーク国RoskildeのNunc社製)上にプレートした。プレートしたニューロンを組換えヒトTGF- β 1(10ng/ml; R&D Systems社製)又は対照としての溶媒(PBS)と共に24時間インキュベートした。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、モノクローナル抗体TuJ1(1:1000、Covance社製)で染色した。各TuJ1陽性ニューロンで最も長い神経突起の長さを測定した。

[0028] GTP-RhoAのアフィニティ沈殿

1% Triton X-100（商品名）、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、500mM NaCl及び10mM MgCl₂並びに各10 μ g/mLのロイペプチン及びアプロチニンを含む50mM Tris, pH7.5中に溶解した。細胞溶解物を13,000gで4℃、10分間遠心して清澄化し、上清を、20 μ gのRhotekinビーズ（商品名）のGST-Rho結合ドメインと共に4℃で45分間インキュベートした。ビーズを3回、洗浄バッファー（1% Triton X-100（商品名）、0.1% SDS、150mM NaCl及び10mM MgCl₂並びに各10 μ g/mLのロイペプチン及びアプロチニンを含む50mM Tris, pH7.5）で洗浄した。抗RhoA抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc. 社製）を用いたウェスタンブロットによりRhoAの検出を行った。

[0029] 行動試験

損傷後、12週間にわたり、オープンフィールド内で、行動の回復を、Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 運動評価尺度 (locomotor rating scale) (非特許文献8) で評価した。損傷されていない偽手術ラット (n=3) は、満点であった。定量は盲検的に行った。

[0030] 結果

TGF- β 1の中和はSCI後の運動回復を促進する

内発性TGF- β 1の阻害が、SCI後の機能回復に寄与するか否かを調べた。本実施例では、抗TGF- β 1中和抗体（入手先：R&D Systems社製）を用いた。また、本実施例では、臨床の状態をより良く模するために、ラットの脊髄挫傷モデルを用いた。脊椎レベルTh9/T10の部位で、無限水平衝撃器（商品名IH impactor）を用いて脊髄を挫傷させた。抗TGF- β 1中和抗体又は対照IgGは、損傷部位の上部の髄腔内に置いたカテーテルを用いて2週間にわたり、浸透圧ミニポンプにより送達した。動物の運動能力は、損傷後12週間に亘り監視した。偽手術ラット（図1）は、後足の運動を評価するBasso-Beattie-Bresnahan (BBB) 運動評価尺度で満点であった。全てのSCIラットは、損傷後1～7日間は、ほぼ完全に麻痺状態であった。BBBスコアに示されるように、これらの動物は、徐々に運動行動の部分的な回復を示した（図1）。損傷後5～12週間の間、抗TGF- β 1抗体を投与したラットの運動能力は、対照IgGを投与し

たラットに比べて良い傾向を示した。損傷 1 2 週間後、対照 IgG を投与したラットは、BBB スコアが平均で 10.1 であったが、抗 TGF- β 1 抗体を投与したラットは、BBB スコアが平均で 14.4 と有意に高かった（図 1）。このように、本実施例のデータは、抗 TGF- β 1 抗体の投与により、ラットにおける脊髄損傷後の運動回復が有意に改善されることを示している。

[0031] TGF- β 1 の阻害は SCI 後の瘢痕を減少させる

グリア性瘢痕が、中枢神経系 (CNS) 損傷後の軸索成長の阻害の重要なソースであることはよく確立されている（非特許文献 9）。損傷に対するグリア性応答により、ミクログリア、乏突起膠細胞前駆体、髄膜細胞及び星状細胞が損傷部位に集まる。損傷部分における多数の星状細胞がしばしば肥大性になり、反応性の表現型を呈し、CSPGs として知られる、阻害的細胞外マトリックス分子になる。先の研究により、TGF- β 1 を投与することによりグリア性瘢痕が増大することが報告されている（非特許文献 4、非特許文献 5）。そこで、損傷したラット脊髄中の反応性星状細胞の増加を定量分析し、TGF- β 1 の阻害がグリア性瘢痕の形成に影響するかどうかを調べた。反応性星状細胞の数を見積もるために、抗 GFAP 抗体を用いて、対照及び抗 TGF- β 1 抗体投与ラットから得た損傷脊髄の矢状切片を、免疫染色した。対照 SCI ラットでは、SCI の 2 週間後、損傷部位の周辺において GFAP に対する強い免疫反応性が観察されたが、抗 TGF- β 1 抗体投与 SCI ラットでは、GFAP に対する免疫反応性の顕著な低減が見られた。SCI の 1 週間後、2 週間後及び 1 2 週間後に、損傷部位の中心周辺の、GFAP に対する免疫反応性の全面積を測定して星状細胞の増加を見積もった。SCI の 1 週間後においては、抗 TGF- β 1 抗体投与ラットと対照抗体投与ラットの間でグリア性瘢痕形成についての有意差はなかった。しかしながら、SCI の 2 週間後では、TGF- β 1 の阻害により、グリア性瘢痕の形成が明らかに低減された。この差異は、SCI の 1 2 週間後には消えた（図 2i）。

[0032] パーシカン、プレビカン及びニューロカンを含むほとんどの CSPGs が、SCI の 6 ヶ月後までアップレギュレートされることが報告されており（非特許文献 10）、これらの細胞外マトリックス分子が軸索の成長を阻害すると考え

られている。従って、次に、CSPGsの発現を調べた。反応性の星状細胞の増加と符合して、抗TGF- β 1抗体投与ラット（図2j）では、対照IgG投与ラット（図2j）と比較して、SCIの2週間後にCSPGsの発現が有意に低減したが、SCIの1週間後では有意に低減しなかった。

[0033] さらに、SCI後のコラーゲン形成を調べた。抗TGF- β 1抗体投与に起因するコラーゲンの発現低下の傾向がある程度見られたが（図2k）、抗TGF- β 1抗体投与ラットと対照IgG投与ラットの間で、SCIの1週間後、2週間後及び12週間後のいずれにおいても有意差は見られなかった。

[0034] TGF- β 1阻害はミクログリア／マクロファージの蓄積及び活性化を促進する

TGF- β 1は、活性化されたミクログリア／マクロファージの種々の機能を抑制することができる抗炎症剤としての役割を演じることが知られている（非特許文献11）。このため、SCI後のミクログリア／マクロファージの蓄積を調べた。損傷1週間後及び2週間後に、Iba-1についての免疫組織化学を行いミクログリア／マクロファージを特徴付けた。SCI1週間後および2週間後に、損傷部位内において、多数のIba-1陽性ミクログリア／マクロファージが認められた。予想された通り、これらのIba-1陽性ミクログリア／マクロファージの数は、抗TGF- β 1抗体投与により増加するように思われた。ミクログリア／マクロファージの蓄積の程度を定量的に分析するために、損傷部位の周囲（損傷部位中心の周囲10mmの長さ）のIba-1陽性細胞により占められた面積を測定した。その結果、抗TGF- β 1抗体投与により、SCIの2週間後に、Iba-1陽性細胞の蓄積が有意に高められた（図3i）。次に、抗ED-1抗体を用いてミクログリア／マクロファージの活性化を見積もった。なお、ED-1は、活性化マクロファージのマーカーである。抗TGF- β 1抗体投与ラットでは、対照IgG投与ラットに比べて、損傷部位の周囲のより広い範囲においてED-1陽性ミクログリア／マクロファージが広がっていた。抗TGF- β 1抗体投与により、SCI2週間後のED-1陽性細胞に占められる面積が増大したことが統計学的処理により示された（図3j）。従って、これらの知見は、SCI後の損傷部位の周りのミクログリア／マクロファージの蓄積及び活性化が抗TGF- β 1抗体投与により高め

られたことを示している。

[0035] TGF- β 1は、RhoA/Rho-キナーゼ経路の活性化に依存する機構により神経突起の成長を阻害する

上記データにより、TGF- β 1の阻害がSCI後の運動の回復を促進することが示されたので、TGF- β 1阻害により、損傷された神経回路が回復することが示唆された。TGF- β 1阻害により誘導される、グリア性瘢痕の減少及びミクログリア／マクロファージの活性化／蓄積の増大が、機能回復を支持しているように思われるが、TGF- β 1がまた、損傷ニューロンの軸索成長を直接阻害する役割を果たしている可能性もある。TGF- β 1が、インビトロにおいて、哺乳動物のCNS神経突起成長の阻害に寄与しているという仮説を検証するために、小脳顆粒神経細胞 (CGNs) を用いた。出生後のラット (P7-9) から得たCGNsを、10 ng/mLの組換えTGF- β 1 (rTGF- β 1) の存在下又は非存在下で24時間培養し、神経突起の長さを調べた。CGNsをrTGF- β 1で処理した際に神経突起の成長が有意に阻害された (図4b)。神経突起の成長阻害にかかわるシグナル伝達機構を利用するために、TGF- β 1のニューロンに対する効果が、低分子量GTPase RhoA又はその下流のエフェクターであるRho-関連セリン／スレオニンキナーゼ (Rho-kinase) に依存するか否かを調べた。10 μ Mの、Rho-キナーゼの特異的阻害剤であるY27632 (非特許文献12) の存在下又は非存在下でニューロンを24時間培養したところ、TGF- β 1の阻害活性がY27632により低減することが観察された (図4b)。TGF- β 1のシグナル伝達にRhoAが関与するか否かを直接調べるために、エフェクタータンパク質であるRhotekin (非特許文献13) のRhoA結合ドメインを用いた。この試験により、TGF- β 1の添加後10分間以内に、細胞抽出物中のGTP-RhoA量が、対照細胞に比較して増大していた。これらの結果は、TGF- β 1が、RhoA/Rhoキナーゼの活性化に依存する機構により神経突起の成長を阻害することを示している。

[0036] TGF- β 1の中和はセロトニン作動性軸索の成長及び／又は保存を誘導する

神経突起成長アッセイの結果は、TGF- β 1が生体内においても軸索成長を抑制している可能性を示している。そこで、TGF- β 1の阻害により、損傷した二

ューロンの軸索成長が促進されるか否かを調べた。数種類の下行性経路が、SCI後の運動機能の回復に寄与している。免疫組織化学分析により、抗IgG投与SCIラットにおける下行性セロトニン作動性縫線脊髄路軸索を調べた。損傷12週間後、対照SCIラットの損傷部位の尾側10mmにある前角では、損傷部位の頭側10mmの切片と比較して、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)陽性線維の密度が40%減少していた(図4f)。抗TGF- β 1抗体を投与した損傷ラットから得られた試料では、損傷部位の頭側10mmにおける前角中の5-HT陽性線維の密度は、頭側切片中の対照値とほぼ同じであることがわかった(図4f)。しかしながら、損傷部位から尾側10mmの前角中の5-HT陽性線維の密度は、尾側切片中の対照値と比較して有意に増大していた(図4f)。このように、抗TGF- β 1抗体投与により、損傷部位の尾側の縫線脊髄軸索の成長及び／又は保存が促進される。5-HT陽性線維の成長は、尾側部における側枝の発芽及び／又は切断されたセロトニン含有軸索からの遠距離軸索成長の組合せに起因するかもしれない。

[0037] 次に、両側の感覚運動皮質にビオチン化デキストランアミン(BDA)を注入することにより、下行性皮質脊髄路(GST)の完全性を調べた。しかしながら、抗TGF- β 1抗体投与SCIラットにおいても対照のIgG投与ラットにおいても、損傷部位の中心よりも尾側では標識線維は検出されなかった(データ示さず)。次に、損傷部位の中心から40mm頭側で得られた脊髄の遠頭側切片を調べた。なぜなら、この領域におけるGSTからの側枝発芽が、運動回復にとって重要であることが示されているからである(非特許文献14)。SCIラットでは、灰白質、特に後柱に隣接する灰白質においてBDA陽性線維の発芽が検出された。BDA陽性線維の発芽は、抗TGF- β 1抗体投与SCIラットにおける灰白質においても検出された。しかしながら、抗TGF- β 1抗体投与SCIラットと対照のIgG投与SCIラットの間には、灰白質中のBDA陽性線維の数に有意差はなかった(図4k)。このように、上記データは、抗TGF- β 1抗体投与によって、SCI後の損傷GSTの発芽又は再成長が促進されるということを否定している。

図面の簡単な説明

[0038] [図1] 脊髄損傷後、本発明の治療剤を投与したラットの運動能力の回復を、脊髄損傷後、本発明の治療剤を投与しなかったラット及び脊髄を損傷していないラットと比較して示す図である。抗TGF- β 1抗体投与ラット（1群13匹）、対照IgG投与ラット（1群13匹）及び偽手術ラット（1群3匹）のそれぞれについて、SCI後、図示の時点でBBBスコアを測定した。各群の平均±標準偏差で示す。抗TGF- β 1抗体投与群は、SCI後の図示の日において、対照IgG投与群と統計学的に異なっていた。*：対照群と比較して $P<0.05$

[図2] iはグリア性瘢痕形成の定量結果を示す図である。Scion Image Software（商品名）を用い、5匹の対照抗IgG投与ラット（白抜きバー）及び6匹の抗TGF- β 1抗体投与ラットから得た矢状切片を分析した。GFAP免疫反応性が陽性の面積を、各切片の全面積（損傷部位の中心の周囲10mmの長さ）に対する百分率として算出した。データは、3回の独立した実験の平均±標準偏差で示す。SCI 2週間後において、2つの群の間で有意差が見られた。*：対照群と比較して $P<0.05$ jは抗TGF- β 1抗体投与ラット及び対照IgG投与ラットにおけるSCIの1週間後及び2週間後におけるCSPG発現を測定した結果を示す図である。SCI後のCSPG発現の誘導は、抗TGF- β 1抗体投与により抑制された。CSPG免疫反応性が陽性の面積を、各切片の全面積（損傷部位の中心の周囲4mmの長さ）に対する百分率として算出した。データは、3回の独立した実験の平均±標準偏差で示す。*：対照群と比較して $P<0.05$ kはSCIの1週間後、2週間後及び12週間後における挫傷脊髄中のコラーゲンを測定した結果を示す図である。コラーゲン免疫反応性が陽性の面積を、各切片の全面積（損傷部位の中心の周囲4mmの長さ）に対する百分率として算出した。いずれの時点においても2つの群の間に有意差は見られなかった。データは、3回の独立した実験の平均±標準偏差で示す。

[図3] 活性化ミクログリア／マクロファージの定量結果を示す図である。Scion Image Software（商品名）を用い、5匹の対照抗IgG投与ラット（白抜きバー）及び6匹の抗TGF- β 1抗体投与ラットから得た、SCIの1週間後及び2週間後の矢状切片を分析した。Iba-1免疫反応性(i)又はED-1免疫反応性(k)が陽

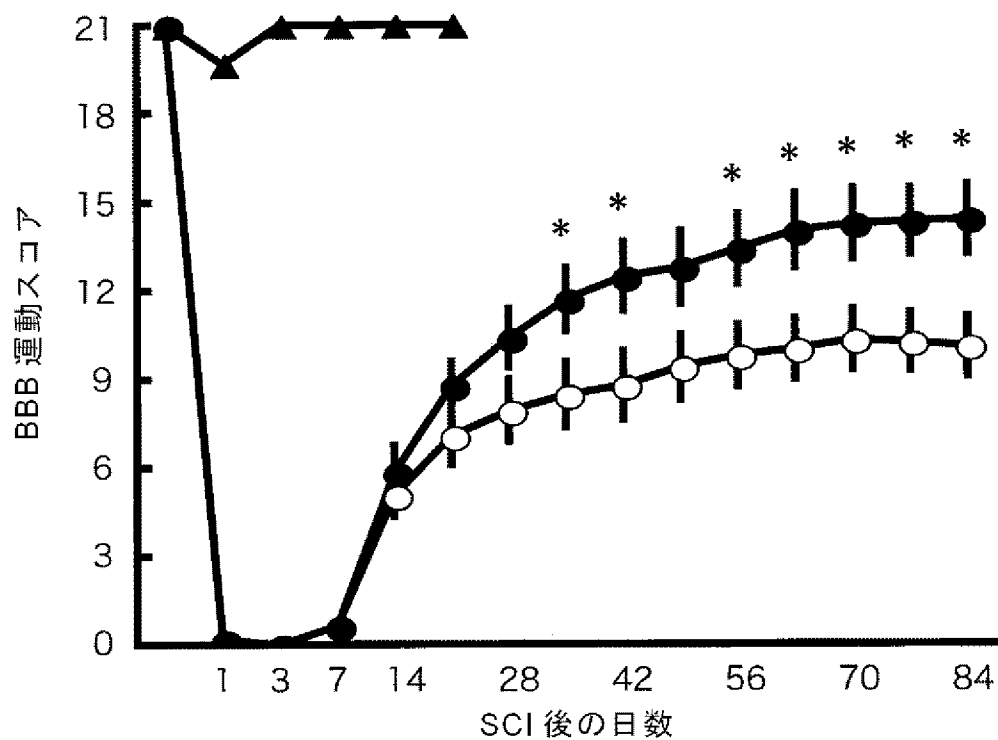
性の面積を、各切片の全面積（損傷部位の中心の周囲4mmの長さ）に対する百分率として算出した。データは、3回の独立した実験の平均±標準偏差で示す。SCIの2週間後、2群の間で有意差が見られた。*: 対照群と比較して $P < 0.05$

[図4] TGF- β 1により軸索の成長が阻害されることを示す図である。CGNsを、ポリ-L-リジン(PLL) でコートしたチャンバースライド上で、 $10 \mu\text{M}$ のY27632の存在下又は非存在下でTGF- β 1(10ng/mL)の存在下又は非存在下で、コンディションド培地中で24時間培養した。bは、ニューロン当たりの神経突起の平均長さを示す。データは、3回の独立した実験の平均±標準偏差で示す。*: 対照群と比較して $P < 0.01$ (Studentのt検定) fは、SCIの12週間後の対照IgG投与ラット及び抗TGF- β 1抗体投与ラットにおける、5-HT陽性線維の定量結果を示す。損傷部位の中心から10mm頭側の切片及び10mm尾側の切片を用いてセロトニン作動性の線維を測定した。損傷部位の中心から10mm尾側において、2群の間で有意差が見られた。白抜きバー: 対照群、黒塗りバー: 抗TGF- β 1抗体投与群。*: 対照群と比較して $P < 0.05$ kは、SCIの12週間後の対照IgG投与ラット及び抗TGF- β 1抗体投与ラットにおける、損傷部位の中心から40mm頭側の切片における、灰白質中のBDA-標識CST線維の数と、正常な脊髄の同切片における数との比を示す図である。対照IgG投与群と抗TGF- β 1抗体投与群との間に有意差はなかった。

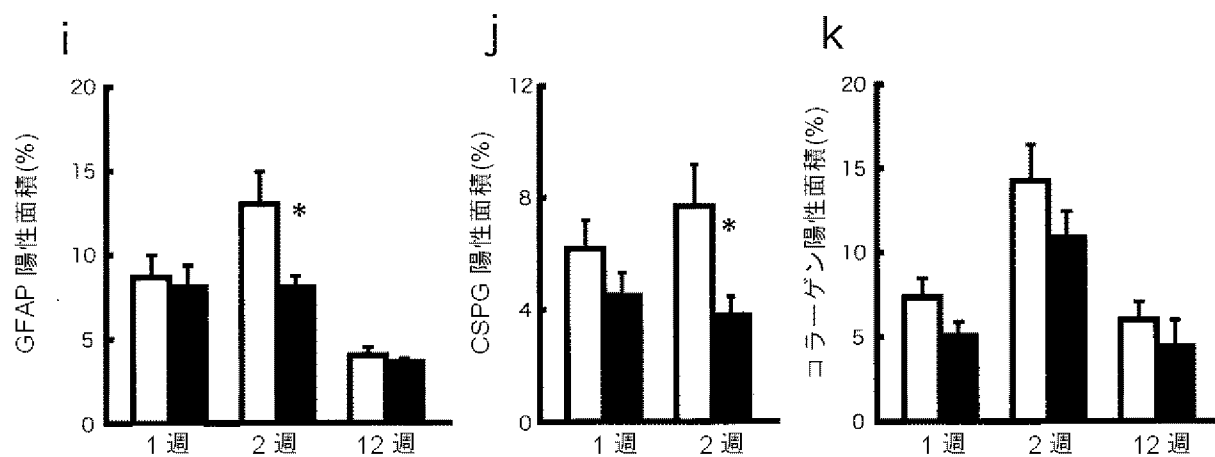
請求の範囲

- [請求項1] TGF- β 1阻害剤を有効成分として含有する中枢神経損傷治療剤。
- [請求項2] 前記TGF- β 1阻害剤が、抗TGF- β 1抗体又はその抗原結合性断片である請求項 1 記載の治療剤。
- [請求項3] 前記TGF- β 1阻害剤が、抗TGF- β 1中和抗体である請求項1又は2記載の治療剤。
- [請求項4] 前記中枢神経が脊髄である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の治療剤。
- [請求項5] 抗TGF- β 1中和抗体を有効成分として含有する脊髄損傷治療剤。
- [請求項6] 軸索の成長促進剤及び／又は軸索の保存剤である請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の治療剤。
- [請求項7] 前記軸索が、セロトニン作動性軸索である請求項 6 記載の治療剤。
- [請求項8] TGF- β 1阻害剤の、中枢神経損傷治療剤の製造のための使用。
- [請求項9] 抗TGF- β 1中和抗体の、脊髄損傷治療剤の製造のための使用。
- [請求項10] 前記中枢神経損傷治療剤又は脊髄損傷治療剤が、軸索の成長促進剤及び／又は軸索の保存剤である請求項 8 又は 9 記載の使用。
- [請求項11] 前記軸索が、セロトニン作動性軸索である請求項 1 0 記載の使用。
- [請求項12] 治療に有効な量のTGF- β 1阻害剤を、中枢神経の損傷部位に投与することを含む、損傷した中枢神経の治療方法。
- [請求項13] 軸索の成長促進方法及び／又は軸索の保存方法である請求項 1 2 記載の方法。
- [請求項14] 前記軸索が、セロトニン作動性軸索である請求項 1 3 記載の方法。

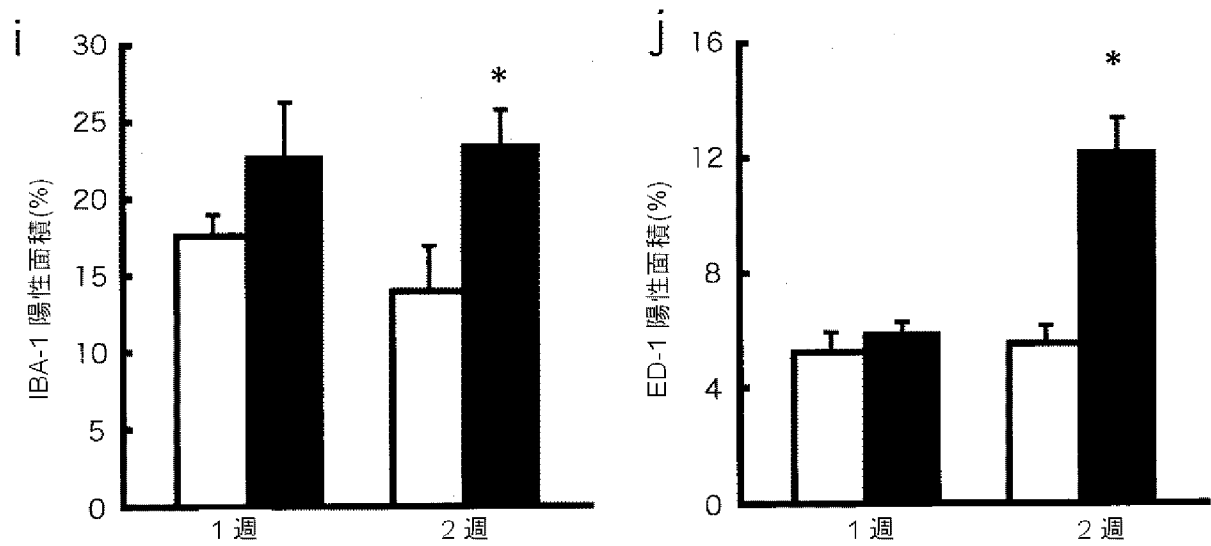
[図1]



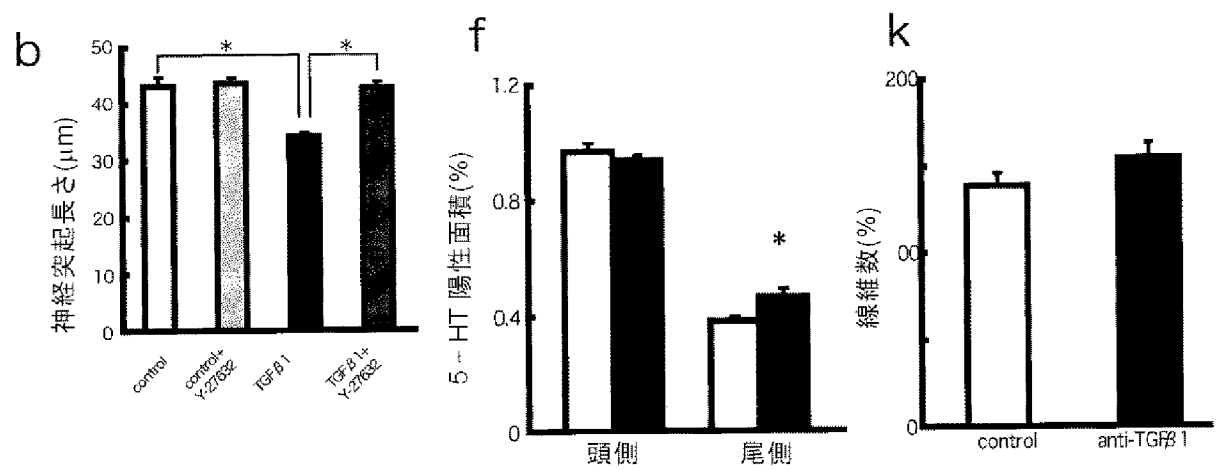
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/00(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)

A61K45/00, A61K39/395, A61P25/00

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, PATENT FILE(PATOLIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Masaaki KOTA, "Sekizui Sonshogo no TGFbetal no Seigyo", Shinkei Soshiki no Seicho·Saisei·Ishoku Kenkyukai Gakujutsu Shukai Dai 23 Kai Gakujutsu Shukai Program·Yokoshu, 17 May, 2008 (17.05.08), page 36, Poster #. P2	1-11
X	WO 93/19783 A1 (THE WHITTIER INSTITUTE FOR DIABETES AND ENDOCRINOLOGY), 14 October, 1993 (14.10.93), Page 8; 'example VIII' & US 5958411 A	1-11
X	WO 05/074981 A2 (REGENION GMBH), 18 August, 2005 (18.08.05), 'Examples 1 & 3' & EP 1716235 A & JP 2007-521815 A	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
15 September, 2009 (15.09.09)

Date of mailing of the international search report
06 October, 2009 (06.10.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065161

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	Masaaki KOTA et al., "Sekizui Sonshogo no Transforming Growth Factor-beta1 Sogai wa Undo Kaifuku o Sokushin suru", Nippon Shinkei Geka Gakkai Sokai Dai 67 Kai Gakujutsu Shukai Program, 01 September, 2008 (01.09.08), Endai #. 3J-10-P92-04	1-11
A	DE, S.A. et al, Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1, Eur. J. Neurosci., 2002, Vol.16, No.11, pp.2059-69	1-11
A	ASHER, R.A. et al, Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes, J. Neurosci., 2000, Vol.20, No.7, pp.2427-38	1-11
A	HIRANO, S. et al, Astrocytes express type VIII collagen during the repair process of brain cold injury, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol.317, No.2, pp.437-43	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065161

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 12-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12 to 14 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest
the

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

<Subject of search>

Claims 1, 4, 6-8, 10 and 11 relate to a therapeutic agent for central nervous system injury which comprises a compound defined by a desired property "a TGF- β 1 inhibitor" as an active ingredient or use of the compound for producing the agent.

Claims 1, 4, 6-8, 10 and 11 include all of the compounds having the property. However, those compounds which are disclosed in the meaning within PCT Article 5 are limited to an extremely small part of the compounds claimed in these claims. Therefore, it cannot be considered that these claims are supported by the disclosure of the description in the meaning within PCT Article 6.

Further, even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into consideration, it is impossible to specify the scope of the compound having the property "a TGF- β 1 inhibitor". Therefore, claims 1, 4, 6-8, 10 and 11 do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6.

Such being the case, the search was made on the relationship between "a TGF- β 1 inhibitor" and central nervous system injury, and also made on a therapeutic agent for central nervous system injury or a therapeutic agent for spinal cord injury comprising an anti-TGF- β 1 neutralizing antibody, which is specifically disclosed in the description, as an active ingredient.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/00(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 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00, A61K39/395, A61P25/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, 特許ファイル(PATOLIS)

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	甲田将章, 脊髄損傷後の TGFβ ₁ の制御, 神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 第 2 3 回学術集会 プログラ ム・予稿集, 2008.05.17, 第 3 6 頁, ポスター#. P 2	1-11
X	WO 93/19783 A1 (THE WHITTIER INSTITUTE FOR DIABETES AND ENDOCRINOLOGY) 1993.10.14, 第 8 頁及び「Example VIII」 & US 5958411 A	1-11

☒ 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

1 5 . 0 9 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 6 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

上條 のぶよ

4 C

4 4 9 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 05/074981 A2 (REGENION GMBH) 2005.08.18, 「Example 1 & 3」 & EP 1716235 A & JP 2007-521815 A	1-11
XP	甲田将章 ほか、脊髄損傷後の Transforming Growth Factor-beta1 阻害は運動回復を促進する, 日本神経外科学会総会第67回学術集会 プログラム, 2008.09.01, 演題#. 3J-10-P92-04	1-11
A	DE, S.A. et al, Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1, Eur. J. Neurosci., 2002, Vol.16, No.11, pp.2059-69	1-11
A	ASHER, R.A. et al, Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes, J. Neurosci., 2000, Vol.20, No.7, pp.2427-38	1-11
A	HIRANO, S. et al, Astrocytes express type VIII collagen during the repair process of brain cold injury, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol.317, No.2, pp.437-43	1-11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☒ 請求項 1 2 - 1 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 2 - 1 4 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

<調査の対象について>

請求項1, 4, 6-8, 10, 11は、それぞれ「TGF- β 1阻害剤」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする中枢神経損傷治療剤又は当該剤の製造のための使用に関するものである。

そして、請求項1, 4, 6-8, 10, 11は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは請求項に記載された化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「TGF- β 1阻害剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求項1, 4, 6-8, 10, 11は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、「TGF- β 1阻害剤」と中枢神経損傷との関係について、及び、明細書に具体的に記載された抗TGF- β 1中和抗体を有効成分とする中枢神経損傷治療剤又は脊髄損傷治療剤について行った。