明　細　書

発明の名称 ： 自己組織化ペプチドおよび高強度ペプチドゲル

技術分野

[0001] 本発明は、高強度なペプチドゲルを形成し得る自己組織化ペプチド、および該ペプチドから形成されるペプチドゲルに関する。

背景技術

[0002] 再生医療分野における研究および実際の治療において使用するスキャフォールド（細胞の足場）として、コラーゲンゲルが一般に用いられている。しかし、コラーゲンゲルは動物由来であるため、未知の感染症の恐れがある。この未知の感染症の不安を取り除く手段として、化学的に合成される材料由来のスキャフォールドが存在する。このような材料としては、例えば、特許文献１または特許文献２で開示されるような自己組織化ペプチドが挙げられる。しかしながら、特許文献１または２の自己組織化ペプチドから得られるスキャフォールド（ペプチドゲル）は、力学的強度が不十分であるので、例えば、ピンセットでつまむと崩れてしまう等の操作性の問題がある。また、特許文献１の自己組織化ペプチドゲルは、中性領域において、透明性が不十分であるという問題がある。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：ＵＳ５６７０４８３

特許文献2：ＷＯ２００７／０００９７９号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、その目的は、実用上十分な力学的強度を有するペプチドゲル、および該ペプチドゲルを形成し得る自己組織化ペプチドを提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明によれば、自己組織化ペプチドが提供される。該自己組織化ペプチドは、下記のアミノ酸配列からなる。

アミノ酸配列：$a_1b_1c_1b_2a_2b_3db_4a_3b_5c_2b_6a_4$

（該アミノ酸配列中、a_1～a_4は、塩基性アミノ酸残基であり；b_1～b_6は、非電荷極性アミノ酸残基および／または疎水性アミノ酸残基であり、ただし、そのうちの少なくとも５個は、疎水性アミノ酸残基であり；c_1およびc_2は、酸性アミノ酸残基であり；ｄは、疎水性アミノ酸残基である。）

好ましい実施形態においては、上記アミノ酸配列中、b_3およびb_4が、疎水性アミノ酸残基である。

好ましい実施形態においては、上記アミノ酸配列中、b_1～b_6がすべて、疎水性アミノ酸残基である。

好ましい実施形態においては、上記アミノ酸配列中、b_1～b_6が、それぞれ独立してアラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、またはイソロイシン残基である。

好ましい実施形態においては、上記アミノ酸配列中、ｄがアラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、またはイソロイシン残基である。

好ましい実施形態においては、上記自己組織化ペプチドは、ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ（配列番号１）、ＲＬＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号２）、ＲＡＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ（配列番号６）、ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＡＲ（配列番号７）、ＲＡＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号８）、ＲＡＤＬＲＬＬＬＲＬＤＡＲ（配列番号９）、ＲＬＤＬＲＡＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号１０）、または、ＲＬＤＬＲＬＬＡＲＬＤＬＲ（配列番号１１）のアミノ酸配列からなるペプチドである。

好ましい実施形態においては、上記自己組織化ペプチドは、ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ（配列番号１）、または、ＲＬＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号２）のアミノ酸配列からなるペプチドである。

本発明の別の局面によれば、修飾ペプチドが提供される。該修飾ペプチドは、上記自己組織化ペプチドのＮ末端アミノ基および／またはＣ末端カルボ

キシル基が修飾されたペプチドであって、自己組織化能を有する。

好ましい実施形態においては、上記Ｎ末端アミノ基および／またはＣ末端カルボキシル基に、ＲＧＤを含むアミノ酸配列が付加されている。

本発明のさらに別の局面によれば、ペプチドゲルが提供される。該ペプチドゲルは、上記自己組織化ペプチドおよび／または上記修飾ペプチドを含む水溶液から形成される。

好ましい実施形態においては、上記水溶液がさらに添加物を含む。

好ましい実施形態においては、上記添加物が、ｐＨ調整剤、アミノ酸類、ビタミン類、糖類、多糖類、アルコール類、多価アルコール類、色素、生理活性物質、酵素、抗体、ＤＮＡ、およびＲＮＡからなる群より選択される少なくとも一つである。

好ましい実施形態においては、上記ペプチドゲルを、２２℃の温度条件下で、先端が直径３．２ｍｍ、曲率半径１．６ｍｍの球状であるジグを用い、０．０５ｍｍ／ｓの圧縮速度で行った圧縮試験において、圧縮開始から８～１０秒後までの測定値の近似直線における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌ（ｇ／s）が０．０３ｇ／s以上である。

本発明のさらに別の局面によれば、細胞培養用基材が提供される。該細胞培養用基材は、上記自己組織化ペプチド、上記修飾ペプチド、および上記ペプチドゲルからなる群より選択される少なくとも一つを含む。

本発明のさらに別の局面によれば、無菌ペプチドの製造方法が提供される。該無菌ペプチドの製造方法は、上記自己組織化ペプチドおよび／または修飾ペプチドを、加圧条件下、１００℃以上で滅菌する工程を含む。

本発明のさらに別の局面によれば、ペプチドゲルでコーティングされた物品の製造方法が提供される。該ペプチドゲルでコーティングされた物品の製造方法は、上記ペプチドゲルを凍結する工程、

該凍結物を融解してペプチドゾルを得る工程、

コーティング対象物品の表面の少なくとも一部を該ペプチドゾルでコーティングする工程、および

該ペプチドゾルからペプチドゲルを再形成する工程を含む。

発明の効果

[0006] 本発明の特定のアミノ酸配列を有する自己組織化ペプチドによれば、実用的な力学的強度を有するペプチドゲルが得られ得る。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]ｎ－ＲＡＤＡＲＡＡＡＲＡＤＡＲ―ｃの配列からなるペプチド間の距離を説明する模式図である。図中のＮ末端とＣ末端とを結ぶ主鎖中の太線はペプチド結合を示す。

[図2]実施例１のペプチドゲルの圧縮試験の結果を示すグラフである。

[図3]（ａ）実施例１のペプチドゲルをピンセットではさんだときの写真であり、（ｂ）実施例２のペプチドゲルをピンセットではさんだときの写真であり、（ｃ）比較例１のペプチドゲルをピンセットではさんだときの写真である。

[図4]実施例２のペプチドゲルの圧縮試験の結果を示すグラフである。

[図5]実施例３のペプチドゲルの圧縮試験の結果を示すグラフである。

[図6]比較例１のペプチドゲルの圧縮試験の結果を示すグラフである。

[図7]比較例２のペプチドゲルの圧縮試験の結果を示すグラフである。

[図8]実施例４のペプチドゲルの圧縮試験の結果を示すグラフである。

[図9]実施例７における細胞増殖率を示すグラフである。

[図10]（ａ）は滅菌処理前のペプチド水溶液の質量分析結果であり、（ｂ）は滅菌処理後のペプチド水溶液の質量分析結果である。

[図11]（ａ）は滅菌処理前の商品名「ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ™」（スリー・ディー・マトリックス社製）の質量分析結果であり、（ｂ）は滅菌処理後の商品名「ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ™」（スリー・ディー・マトリックス社製）の質量分析結果である。

[図12]（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）はそれぞれ、ゲルをシャーレに移した時の写真、凍結したゲルの写真、およびペプチドゲルで表面全体が均一にコーティングされたシャーレの写真である。

[図13]（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）はそれぞれ、ゲルをスライドガラスに移した時の写真、凍結したゲルの写真、およびペプチドゲルで表面全体が均一にコーティングされたスライドガラスの写真である。

発明を実施するための形態

[0008] Ａ．用語の定義

（１）本明細書において、「自己組織化ペプチド」とは、溶媒中において、ペプチド分子同士の相互作用を介して自発的に集合するペプチドをいう。相互作用としては、特に限定されず、例えば、水素結合、イオン間相互作用、ファンデルワールス力等の静電的相互作用、疎水性相互作用が挙げられる。１つの実施形態において、自己組織化ペプチドは、室温の水溶液（例えば、０．４ｗ／ｖ％のペプチド水溶液）中において、自己組織化してナノファイバーまたはゲルを形成し得る。

（２）本明細書において、「ゲル」とは、粘性的な性質と弾性的な性質とを併せ持つ粘弾性物質をいう。

（３）本明細書において、「親水性アミノ酸」は、アルギニン（Ａｒｇ／Ｒ）、リシン（Ｌｙｓ／Ｋ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ／Ｈ）等の塩基性アミノ酸、アスパラギン酸（Ａｓｐ／Ｄ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ／Ｅ）等の酸性アミノ酸、チロシン（Ｔｙｒ／Ｙ）、セリン（Ｓｅｒ／Ｓ）、トレオニン（Ｔｈｒ／Ｔ）、アスパラギン（Ａｓｎ／Ｎ）、グルタミン（Ｇｌｎ／Ｑ）、システイン（Ｃｙｓ／Ｃ）等の非電荷極性アミノ酸を含む。上記括弧内のアルファベットはそれぞれ、アミノ酸の三文字表記および一文字表記である。

（４）本明細書において、「疎水性アミノ酸」は、アラニン（Ａｌａ／Ａ）、ロイシン（Ｌｅｕ／Ｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ／Ｉ）、バリン（Ｖａｌ／Ｖ）、メチオニン（Ｍｅｔ／Ｍ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ／Ｆ）、トリプトファン（Ｔｒｐ／Ｗ）、グリシン（Ｇｌｙ／Ｇ）、プロリン（Ｐｒｏ／Ｐ）等の非極性アミノ酸を含む。上記括弧内のアルファベットはそれぞれ、アミノ酸の三文字表記および一文字表記である。

[0009] Ｂ．自己組織化ペプチド

本発明の自己組織化ペプチドは、下記のアミノ酸配列からなる。

アミノ酸配列：$a_1b_1c_1b_2a_2b_3db_4a_3b_5c_2b_6a_4$

（上記アミノ酸配列中、a_1～a_4は、塩基性アミノ酸残基であり；b_1～b_6は、非電荷極性アミノ酸残基および／または疎水性アミノ酸残基であり、ただし、そのうちの少なくとも５個は、疎水性アミノ酸残基であり；c_1およびc_2は、酸性アミノ酸残基であり；ｄは、疎水性アミノ酸残基である。）

[0010] 一般に、自己組織化ペプチドは、水溶液中で、親水性の側鎖が配置される面と疎水性の側鎖が配置される面とからなるβシート構造をとり、親水性面間に働く水素結合、イオン間相互作用等および疎水性面間に働く疎水性相互作用等の相互作用によって、複数のペプチドが自発的に集合すると考えられている。そのため、従来の自己組織化ペプチドにおいては、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸とを、交互に、かつ、等しい割合で有することが非常に重要とされている（例えば、特許文献１参照）。

[0011] これに対し、本発明の自己組織化ペプチドは、上記のとおり、７位の疎水性アミノ酸残基を中心として、一残基おきに塩基性アミノ酸残基（１、５、９、および１３位）および酸性アミノ酸残基（３および１１位）をＮ末端方向およびＣ末端方向に対称の位置に有する１３残基のアミノ酸配列からなる。すなわち、本発明の自己組織化ペプチドは、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸とを交互に有さないことを１つの特徴とする。また、本発明の自己組織化ペプチドは、親水性アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基とを等しい割合で有さないことを別の特徴とする。また、本発明の自己組織化ペプチドは、７位の疎水性アミノ酸残基を中心として、４個の塩基性アミノ酸残基と２個の酸性アミノ酸残基とを所定の対称の位置に有し、Ｎ末端とＣ末端のアミノ酸残基がともに塩基性アミノ酸残基であることをさらに別の特徴とする。一般的には、７位を疎水性アミノ酸残基とすることは、βシート構造の形成にとって不利になり、また、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸との割合を不均等にするので、ペプチドの自己組織化能に悪影響を及ぼすと考えられてきた。しかしながら、本発明の自己組織化ペプチドは、優れた自己組織化能を有し

、さらには、従来よりも力学的強度に優れたペプチドゲルを形成し得る。このような効果が奏される理由は定かではないが、７位を疎水性アミノ酸とすることに加えて、塩基性アミノ酸残基を酸性アミノ酸残基よりも２個多く有し、かつ、それぞれのアミノ酸残基を特定の位置に有することにより、βシート構造を形成する能力を維持しつつ、ペプチド分子間に静電的引力と静電的斥力とが極めて優れたバランスで働くことによるものと考えられる。

[0012] 上記自己組織化ペプチドを構成するアミノ酸は、Ｌ－アミノ酸であってもよく、Ｄ－アミノ酸であってもよい。また、天然アミノ酸であってもよく、非天然アミノ酸であってもよい。低価格で入手可能であり、ペプチド合成が容易であることから、好ましくは天然アミノ酸である。

[0013] 上記アミノ酸配列中、a_1～a_4は、塩基性アミノ酸残基である。塩基性アミノ酸は、好ましくはアルギニン、リシン、またはヒスチジンであり、より好ましくはアルギニンまたはリシンである。これらのアミノ酸は、塩基性が強いからである。a_1～a_4は、同一のアミノ酸残基であってもよく、異なるアミノ酸残基であってもよい。

[0014] 上記アミノ酸配列中、b_1～b_6は、非電荷極性アミノ酸残基および／または疎水性アミノ酸残基であり、そのうちの少なくとも５個は、疎水性アミノ酸残基である。疎水性アミノ酸は、好ましくはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、またはプロリンである。非電荷極性アミノ酸は、好ましくはチロシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、またはシステインである。これらのアミノ酸は、入手が容易だからである。

[0015] 好ましくは、b_3およびb_4は、それぞれ独立して任意の適切な疎水性アミノ酸残基であり、さらに好ましくはロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、またはイソロイシン残基であり、特に好ましくはロイシン残基またはアラニン残基である。上記アミノ酸配列において、それぞれ６位と８位に位置するb_3とb_4が疎水性アミノ酸残基である場合、６～８位の３つのアミノ酸残基が連続して疎水性アミノ酸残基となる。このようにアミノ酸配列の中心

に形成された疎水性領域は、その疎水性相互作用等により、強度に優れたペプチドゲルの形成に寄与し得ると推測される。

[0016] 好ましくは、b_1～b_6はすべて疎水性アミノ酸残基である。自己組織化ペプチドが好適にβシート構造を形成し、自己組織化し得るからである。より好ましくは、b_1～b_6は、それぞれ独立してロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、またはイソロイシン残基であり、さらに好ましくはロイシン残基またはアラニン残基である。好ましい実施形態においては、b_1～b_6のうちの４個以上がロイシン残基であり、特に好ましくはそのうちの５個以上がロイシン残基であり、最も好ましくはすべてがロイシン残基である。水への溶解性に優れ、かつ、高強度のペプチドゲルを形成し得る自己組織化ペプチドが得られ得るからである。

[0017] 上記アミノ酸配列中、c_1およびc_2は、酸性アミノ酸残基である。酸性アミノ酸は、好ましくはアスパラギン酸またはグルタミン酸である。これらのアミノ酸は、入手が容易だからである。c_1およびc_2は、同一のアミノ酸残基であってもよく、異なるアミノ酸残基であってもよい。

[0018] 上記アミノ酸配列中、ｄは、疎水性アミノ酸残基である。上記のとおり、ｄが疎水性アミノ酸残基であり、かつ、所定の対称構造を有することにより、上記自己組織化ペプチドは従来のペプチドゲルよりも力学的強度に優れたゲルを形成し得ると考えられる。このような効果が奏される理由は定かではないが、本発明の自己組織化ペプチドは、７位のアミノ酸残基ｄが疎水性アミノ酸残基であることにより、自己組織化する際のペプチド同士の重なりが一定となり、均一性が高い集合状態を形成し得るためと推測される。

[0019] ｄは、好ましくはアラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、またはイソロイシン残基である。この場合、自己組織化ペプチドが形成するβシート構造の親水性面側のアミノ酸の側鎖長は非相補的となり得るが、該自己組織化ペプチドは、優れた自己組織化能を発揮し得、さらには、従来よりも力学的強度に優れたペプチドゲルを形成し得る。これは、自己組織化にとって好適な静電的引力を得るためには、βシート構造の親水性面側のアミノ酸の側鎖

長が相補的であることが好ましいという従来の知見とは大きく異なる効果である。ここで、「側鎖長が相補的」とは、相互作用を発揮する一対のアミノ酸残基（例えば、塩基性アミノ酸残基と酸性アミノ酸残基）の側鎖長に主として関与する原子の数の和が一定であることをいう。例えば、図１は、側鎖長が非相補的な場合のペプチド間の距離を説明する模式図である。図１に示されるとおり、点線で囲まれるアラニン残基－アルギニン残基対の側鎖長に主として関与する原子の数の和（７）は、実線で囲まれるアスパラギン酸残基－アルギニン残基対の側鎖長に主として関与する原子の数の和（９）よりも小さい。

[0020] 上記自己組織化ペプチドに含まれるアミノ酸残基の中性領域における電荷の総和は、実質的に＋２である。すなわち、上記自己組織化ペプチドは、中性領域において該ペプチドに含まれるアミノ酸残基の側鎖に由来するプラス電荷とマイナス電荷とが相殺されない。加えて、Ｎ末端とＣ末端のアミノ酸残基がともに塩基性アミノ酸残基であることから、本発明の自己組織化ペプチドは、例えば、ペプチド間に静電的引力に加えて静電的斥力が働き、これらの微妙なバランスが保たれることで過度の会合が実質的に生じないため、中性領域で沈殿することなく安定なゲルを形成し得ると推測される。なお、本明細書において、「中性領域」とは、ｐＨ６～８、好ましくは、ｐＨ６．５～７．５の領域をいう。

[0021] 各ｐＨにおける上記自己組織化ペプチドの電荷は、例えば、レーニンジャー（Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ）〔Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ、１９７９〕の方法に従って算出され得る。レーニンジャーの方法は、例えば、ＥＭＢＬ ＷＷＷ Ｇａｔｅｗａｙ ｔｏ Ｉｓｏｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｐｏｉｎｔ Ｓｅｒｖｉｃｅのウェブサイト（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｅｍｂｌ－ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ．ｄｅ／ｃｇｉ／ｐｉ－ｗｒａｐｐｅｒ．ｐｌ）上で利用可能なプログラムにより行なわれ得る。

[0022] 上記自己組織化ペプチドを含む水溶液は、力学的強度に優れたペプチドゲルを形成し得る。１つの実施形態においては、自己組織化ペプチド水溶液（

好ましくは０．２～５ｗ／ｖ％、さらに好ましくは０．２～２ｗ／ｖ％、特に好ましくは０．２～１ｗ／ｖ％、最も好ましくは０．３～０．８ｗ／ｖ％）は、２２℃の温度条件下で、先端が直径３．２ｍｍ、曲率半径１．６ｍｍの球状であるジグを用い、０．０５ｍｍ／ｓの圧縮速度で行った圧縮試験において、圧縮開始から初期（８～１０秒後まで）の測定値の近似直線における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌ（ｇ／s)が、好ましくは０．０３ｇ／ｓ以上、さらに好ましくは０．０３５ｇ／ｓ以上、特に好ましくは０．０４ｇ／ｓ以上のゲルを形成し得る。該圧縮試験は、後述の実施例に記載のとおり、例えば、ステンレススチール製ジグ（ティー・エイ・インスツルメント社製）を取り付けた粘弾性測定装置（ティー・エイ・インスツルメント社製、製品番号「ＲＳＡ　ＩＩＩ」）を用いて行うことができる。

[0023] 本発明の好ましい実施形態の自己組織化ペプチドを以下に例示する。

ｎ－ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ－ｃ（配列番号１）

ｎ－ＲＬＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ－ｃ（配列番号２）

ｎ－ＲＡＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ－ｃ（配列番号６）

ｎ－ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＡＲ－ｃ（配列番号７）

ｎ－ＲＡＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ－ｃ（配列番号８）

ｎ－ＲＡＤＬＲＬＬＬＲＬＤＡＲ－ｃ（配列番号９）

ｎ－ＲＬＤＬＲＡＬＬＲＬＤＬＲ－ｃ（配列番号１０）

ｎ－ＲＬＤＬＲＬＬＡＲＬＤＬＲ－ｃ（配列番号１１）

[0024] 上記自己組織化ペプチドは、任意の適切な製造方法によって製造され得る。例えば、Ｆｍｏｃ法等の固相法又は液相法等の化学合成方法、遺伝子組換え発現等の分子生物学的方法が挙げられる。

[0025] Ｃ．修飾ペプチド

本発明の修飾ペプチドは、自己組織化能を有する限りにおいて、上記自己組織化ペプチドに任意の修飾を施したペプチドである。修飾が行われる部位は、上記自己組織化ペプチドのＮ末端アミノ基であってもよく、Ｃ末端カルボキシル基であってもよく、その両方であってもよい。

[0026] 上記修飾としては、得られる修飾ペプチドが自己組織化能を有する範囲において任意の適切な修飾が選択され得る。例えば、Ｎ末端アミノ基のアセチル化、Ｃ末端カルボキシル基のアミド化等の保護基の導入；アルキル化、エステル化、またはハロゲン化等の官能基の導入；水素添加；単糖、二糖、オリゴ糖、または多糖等の糖化合物の導入；脂肪酸、リン脂質、または糖脂質等の脂質化合物の導入；アミノ酸またはタンパク質の導入；ＤＮＡの導入；その他生理活性を有する化合物等の導入が挙げられる。アミノ酸またはタンパク質が導入される場合、導入後のペプチドは上記自己組織化ペプチドのＮ末端および／またはＣ末端に任意のアミノ酸が付加されたペプチドであるが、本明細書においては、該付加ペプチドも修飾ペプチドに含む。修飾は１種のみ行われてもよく、２種以上を組み合わせて行ってもよい。例えば、上記自己組織化ペプチドのＣ末端に所望のアミノ酸を導入した付加ペプチドのＮ末端をアセチル化し、Ｃ末端をアミド化してもよい。

[0027] 上記付加ペプチド（修飾ペプチド）は、全体として、上記自己組織化ペプチドの特徴を有さない場合がある。具体的には、任意のアミノ酸の付加により、７位の疎水性アミノ酸配列を中心としてＮ末端方向の配列とＣ末端方向の配列とが非対称となる場合、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸とを等しい割合で有する場合等がある。このような場合であっても、上記自己組織化ペプチドが極めて優れた自己組織化能を有するので、任意のアミノ酸が付加された付加ペプチドもまた、力学的強度に優れたペプチドゲルを形成し得る。

[0028] アミノ酸またはタンパク質が導入される場合、導入後の修飾ペプチドを構成するアミノ酸残基数は、好ましくは１４～２００であり、より好ましくは１４～１００であり、さらに好ましくは１４～５０であり、特に好ましくは１４～３０、最も好ましくは１４～２０である。アミノ酸残基数が２００を超えると、上記自己組織化ペプチドの自己組織化能が損なわれる場合があるからである。

[0029] 導入されるアミノ酸の種類および位置は、修飾ペプチドの用途等に応じて適切に設定され得る。好ましくは、上記自己組織化ペプチドのＮ末端および

／またはＣ末端のアルギニン残基（親水性アミノ酸）から疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸とが交互になるように導入される。

[0030] 導入されるアミノ酸の具体例としては、例えば、細胞接着因子として、ＲＥＤＶ、ＥＩＬＤＶ、ＹＥＫＰＧＳＰＰＲＥＶＶＰＲＰＲＰＧＶ、ＫＮＮＯＫＳＥＰＬＩＧＲＫ、ＹＩＧＳＲ、ＲＮＩＡＥＬＬＫＤＩ、ＲＹＶＶＬＰＲＰＶＣＦＥＫＧＭＮＹＴＶＲ、ＩＫＶＡＶ、ＰＤＳＧＲ、および、ＲＧＤ配列を含むアミノ酸配列（例えば、ＧＲＧＤＳＰＡＳＳ、ＲＧＤＮ、ＲＧＤＦ、ＲＧＤＴ、ＲＧＤＡ、ＲＧＤ、および、ＲＧＤＳ）等；核移行シグナルとして、ＰＰＫＫＫＲＫＶ、ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ、ＰＱＰＫＫＫＰ、および、ＱＲＫＲＱＫ等；小胞体移行シグナルとして、ＭＭＳＦＶＳＬＬＬＶＧＩＬＦＷＡＴＥＡＥＱＬＴＬＣＥＶＦＱ等；ミトコンドリア移行シグナルとして、ＭＬＳＬＲＱＳＩＲＦＦＬＰＡＴＲＴＬＣＳＳＲＹＬＬ等；が挙げられる。これらの配列は、単独で導入されてもよく、複数の配列の組み合わせとして導入されてもよい。また、導入されるアミノ酸配列と上記自己組織化ペプチドとは、その間に１つ以上の任意のアミノ酸を介して連結されてもよい。

[0031] 上記修飾は、その種類等に応じて、任意の適切な方法によって行われ得る。

[0032] 上記修飾ペプチドを含む水溶液は、力学的強度に優れたペプチドゲルを形成し得る。１つの実施形態においては、修飾ペプチド水溶液（好ましくは０．２～５ｗ／ｖ％、さらに好ましくは０．２～２ｗ／ｖ％、特に好ましくは０．２～１ｗ／ｖ％、最も好ましくは０．３～０．８ｗ／ｖ％）は、２２℃の温度条件下で、先端が直径３．２ｍｍ、曲率半径１．６ｍｍの球状であるジグを用い、０．０５ｍｍ／ｓの圧縮速度で行った圧縮試験において、圧縮開始から初期（８～１０秒後まで）の測定値の近似直線における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌ（ｇ／s)が、好ましくは０．０３ｇ／ｓ以上、さらに好ましくは０．０３５ｇ／ｓ以上、特に好ましくは０．０４ｇ／ｓ以上のゲルを形成し得る。

[0033] Ｄ．ペプチドゲル

本発明のペプチドゲルは、上記自己組織化ペプチドおよび／または上記修飾ペプチド（以下、「上記自己組織化ペプチドおよび／または上記修飾ペプチド」を「本発明のペプチド」と称する場合がある）を含む水溶液から形成される。本発明のペプチドが水溶液中で自発的に集合して、ナノメートルスケールの幅を有する繊維状の分子集合体、いわゆるナノファイバーを形成し、該ナノファイバー間に働く静電的相互作用を主因として三次元網状構造を形成することにより、ゲルが形成されると推測される。該水溶液中に含まれる本発明のペプチドは、１種類のみであってもよく、２種類以上であってもよい。該水溶液は、本発明のペプチドおよび水に加えて、任意の適切な添加物をさらに含み得る。また、該水溶液は、細胞等の不溶物を含んでいてもよい。

[0034] 上記水溶液中における本発明のペプチド濃度は、好ましくは０．２～５ｗ／ｖ％、さらに好ましくは０．２～２ｗ／ｖ％、特に好ましくは０．２～１ｗ／ｖ％、最も好ましくは０．３～０．８ｗ／ｖ％である。濃度がこの範囲である場合、力学的強度に優れたペプチドゲルが得られ得る。また、細胞培養基材として用いた場合に、良好な細胞生存率が得られ得る。

[0035] 上記添加物は、ペプチドゲルの用途、含まれるペプチドの種類等に応じて適切に選択され得る。添加物の具体例としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩酸、リン酸、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム等のｐＨ調整剤；アミノ酸類；ビタミンＡ、ビタミンＢ群、ビタミンＣ、ビタミンＤ、ビタミンＥおよびその誘導体等のビタミン類；単糖、二糖、オリゴ糖等の糖類；ヒアルロン酸、キトサン、親水化セルロース等の多糖類；エタノール、プロパノール、イソプロパノール等のアルコール類；グリセリン、プロピレングリコール等の多価アルコール類；フェノールレッド等の色素；ホルモン、サイトカイン（造血因子、増殖因子等）、ペプチド等の生理活性物質；酵素；抗体；ＤＮＡ；ＲＮＡ；その他一般的な低分子化合物が挙げられる。添加物は、１種類のみ添加されてもよく、２種類以上組み合わせて添加されてもよい。水溶液中における添加物の濃度は、目的、ペプチドゲルの用途等に

応じて適切に設定され得る。

[0036] 添加物を含む水溶液の具体例としては、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ等の各種緩衝液、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）等の細胞培養用培地、水酸化ナトリウム、塩酸、炭酸水素ナトリウム等でｐＨを調整した水溶液、が挙げられる。

[0037] 上記水溶液は、目的に応じて、任意の適切なｐＨであり得る。たとえば、本発明のペプチドを溶解する前後における水溶液のｐＨは、それぞれ好ましくは５～９であり、さらに好ましくは５．５～８であり、特に好ましくは６．０～７．５である。この範囲であれば、力学的強度に優れたペプチドゲルが得られ得る。さらに、上記水溶液が細胞を含む場合に、良好な細胞生存率が得られ得る。また、ｐＨがこの範囲であれば、高温加圧条件下においてペプチドの分解が生じ難いので、オートクレーブ等の高圧蒸気滅菌処理を施すことができる。その結果、無菌状態のペプチドゲルが簡便に得られ得る。

[0038] 上記細胞としては、目的等に応じて、任意の適切な細胞が選択され得る。細胞は、動物細胞であっても、植物細胞であってもよい。細胞の具体例としては、軟骨細胞、筋芽細胞、骨髄細胞、線維芽細胞、肝細胞、心筋細胞等が挙げられる。

[0039] 本発明のペプチドゲルは、２２℃の温度条件下で、先端が直径３．２ｍｍ、曲率半径１．６ｍｍの球状であるジグを用い、０．０５ｍｍ／ｓの圧縮速度で行った圧縮試験における、圧縮開始から初期（８～１０秒後まで）の測定値の近似直線において、好ましくは０．０３ｇ／ｓ以上、さらに好ましくは０．０３５ｇ／ｓ以上、特に好ましくは０．０４ｇ／ｓ以上の単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌ（ｇ／s）を示す。上記の力学的強度を有するペプチドゲルは、例えば、本発明のペプチドを、好ましくは０．２～５ｗ／ｖ％、さらに好ましくは０．２～２ｗ／ｖ％、特に好ましくは０．２～１ｗ／ｖ％、最も好ましくは０．３～０．８ｗ／ｖ％の濃度で含む水溶液から形成され得る。

[0040] 本発明のペプチドゲルは、光路長１０ｍｍのセル中、３８０ｎｍ～７８０

ｎｍの吸光度で測定した可視光透過率が、好ましくは５０％以上であり、さらに好ましくは７０％以上であり、特に好ましくは９０％以上である。上記の可視光透過率を有するペプチドゲルは、例えば、本発明のペプチドを０．２～２ｗ／ｖ％の濃度で含む水溶液から形成され得る。また、該ペプチドゲルを、室温で長期間（例えば、２ヶ月間）、密封状態で放置した後の可視光透過率の低下率（％）（１００－（保存後の可視光透過率／保存前の可視光透過率×１００））は、好ましくは３０％以下、さらに好ましくは２０％以下、特に好ましくは１０％以下である。このように高い可視光透過率を有するペプチドゲルは、細胞培養用基材として用いられた場合に、蛍光顕微鏡等による細胞観察が容易である等の利点を有する。可視光透過率は、例えば、ＵＶ／ＶＩＳ測定装置を用いて測定することができる。

[0041] 上記ペプチドゲルは、任意の適切な方法によって形成され得る。代表的には、上記ペプチドゲルは、少なくとも１種の本発明のペプチドを含む水溶液を静置することにより形成され得る。静置する際の温度または時間は、本発明のペプチドが自己組織化してゲルを形成する限り特に制限はなく、ゲルの使用目的、該ペプチドの種類、濃度等に応じて適切に設定され得る。静置する時間は、通常１分以上、好ましくは３分以上、より好ましくは５分以上である。温度は、通常４～５０℃、好ましくは１５～４５℃である。

[0042] Ｅ．自己組織化ペプチド、修飾ペプチド、およびペプチドゲルの用途

本発明の自己組織化ペプチド、修飾ペプチド、およびペプチドゲルの好ましい用途としては、例えば、細胞培養用基材；スキンケア用品、ヘアケア用品等の化粧品；じょくそう製剤、骨充填剤、美容形成用注入剤、眼科用手術補助剤、人工硝子体、人工水晶体、関節潤滑剤、点眼剤、ＤＤＳ基材、止血剤等の医薬品；湿潤用保水剤；乾燥剤；コンタクトレンズ等の医療機器へのコーティング剤が挙げられる。

[0043] Ｆ．細胞培養用基材

本発明の細胞培養基材は、上記自己組織化ペプチド、修飾ペプチド、およびペプチドゲルの少なくとも一つを含む。本発明の細胞培養基材は、化学合

成によって得られる自己組織化ペプチドおよび／または修飾ペプチドから形成されるので、病原体等が混入することなく、安全な細胞培養が可能である。また、上記本発明のペプチドから形成されたゲルは、中性領域で透明、かつ、力学的強度に優れ得るので、本発明の細胞培養基材は、細胞培養時の視認性および操作性に優れる。

[0044] 上記細胞培養基材は、その内部において本発明のペプチドが自己組織化し、繊維状となって三次元網目構造を形成している。したがって、細胞培養基材上での培養だけでなく、細胞培養基材中での培養も可能である。

[0045] 細胞培養基材上で培養する場合は、既に形成された本発明のペプチドを含むペプチドゲル上に培養対象の細胞を乗せて培養し得る。細胞培養基材中で培養する場合は、本発明のペプチドまたはペプチド水溶液と細胞または細胞懸濁液とを混合し、該混合物からペプチドゲルを形成して培養し得る。

[0046] ペプチドゲルの液相は、溶媒置換により所望の培養液に置換することができる。溶媒置換は、例えば、商品名「セルカルチャーインサート」等を用いて行われ得る。ペプチドゲルの詳細（ペプチド濃度、水溶液（混合物）が含み得る添加物の種類、ｐＨ等）および形成方法は、上記Ｄ項で記載したとおりである。

[0047] 培養対象の細胞は、目的等に応じて任意の適切な細胞が選択され得る。細胞は、動物細胞であっても、植物細胞であってもよい。細胞の具体例としては、軟骨細胞、筋芽細胞、骨髄細胞、線維芽細胞、肝細胞、心筋細胞等が挙げられる。培養液および培養条件は、培養する細胞の種類、目的等に応じて適切に選択され得る。

[0048] 本発明の細胞培養用基材は、生体適合性および安全性に優れるので、例えば、再生医療分野等での三次元細胞培養において好適に利用され得る。

[0049] Ｇ．無菌ペプチドの製造方法

本発明の無菌ペプチドの製造方法は、上記自己組織化ペプチドおよび／または修飾ペプチドを、加圧条件下、１００℃以上で滅菌する工程を含む。これらのペプチドは、代表的には、ペプチド水溶液または該ペプチド水溶液か

ら形成されたペプチドゲルの形態で滅菌処理に供される。該ペプチド水溶液のｐＨは、好ましくは５～９、さらに好ましくは５．５～８、特に好ましくは６．０～７．５である。このようなｐＨであれば、１００℃以上の温度条件で滅菌してもペプチド分解が実質的に生じないので、無菌状態の本発明のペプチドが得られ得る。ペプチド水溶液およびペプチドゲルについては、上記Ｄ項に記載のとおりである。

[0050] 滅菌方法としては、任意の適切な滅菌方法が採用され得る。例えば、高温高圧の飽和水蒸気による滅菌（いわゆる、オートクレーブ滅菌）方法が好ましく用いられ得る。オートクレーブ滅菌時の圧力は、好ましくは０．１２２～０．２５５ＭＰａ、さらに好ましくは０．１５２～０．２３３Ｍｐａである。また、滅菌温度は、好ましくは１０５～１３５℃、さらに好ましくは１１０～１２５℃である。また、滅菌時間は、好ましくは１～６０分、さらに好ましくは３～４０分、特に好ましくは５～３０分である。

[0051] オートクレーブ滅菌は、市販のオートクレーブ装置を用いて行うことができる。

[0052] Ｈ．ペプチドゲルでコーティングされた物品の製造方法

本発明のペプチドゲルでコーティングされた物品の製造方法は、上記ペプチドゲルを凍結する工程（凍結工程）、該凍結物を融解してペプチドゾルを得る工程（融解工程）、コーティング対象物品の表面の少なくとも一部を該ペプチドゾルでコーティングする工程（コーティング工程）、および該ペプチドゾルからペプチドゲルを再形成する工程（ゲル化工程）を含む。該方法は、必要に応じて、任意の工程をさらに含んでもよい。本発明のペプチドゲルを凍結融解することにより、ペプチド分子間の結合が切断されてゲルを構成する三次元網目構造が崩壊するので、ペプチド分子が水溶液中に均一に分散したゾルが得られ得る。この均一性の高いゾルでコーティング対象物品の表面の少なくとも一部をコーティングしてから該ゾルをゲル化することにより、該物品の表面をペプチドゲルで均一にコーティングすることができる。

[0053] Ｈ－１．凍結工程

凍結条件は、ペプチドゲルが凍結する限りにおいて、任意の適切な条件が採用され得る。凍結温度は、ペプチドゲルが凍結する温度以下であればよい。凍結速度にも制限はなく、徐々に冷凍してもよく、急速冷凍してもよい。例えば、ペプチドゲルを－１０℃以下の温度条件下に置くことで好適に凍結することができる。

[0054] 凍結手段としては、家庭用または業務用冷凍庫、液体窒素等の任意の適切な凍結手段が選択され得る。なお、凍結したペプチドゲルは、融解工程に供するまでの任意の期間、凍結したまま保存することが可能である。

[0055] 凍結されるペプチドゲルが添加物を含むペプチド水溶液から形成されたゲルである場合、該添加物の濃度は、ゲル化工程におけるゲルの再形成に悪影響を及ぼさない濃度であることが好ましい。該濃度は、ペプチドの種類、濃度等に応じて、適切に設定され得るが、通常、低い濃度であることが好ましい。例えば、ＨＥＰＥＳおよびＴｒｉｓ－ＨＣｌ溶液の場合、その終濃度は、好ましくは５０ｍＭ以下、さらに好ましくは４０ｍＭ以下である。炭酸水素ナトリウム溶液および炭酸ナトリウム溶液の場合、その終濃度は、好ましくは５ｍＭ以下、さらに好ましくは４ｍＭ以下である。ＰＢＳ溶液の場合、その終濃度は、好ましくは０．５×ＰＢＳ以下、さらに好ましくは０．３×ＰＢＳ以下である。また、局方生理食塩水の場合、終濃度は、好ましくは０．５重量％以下、さらに好ましくは０．４重量％以下である。

[0056] Ｈ－２．融解工程

融解温度は、上記凍結工程で得られた凍結物が融解してゾルを形成する温度であれば、任意の適切な温度に設定され得る。一定の温度で融解してもよく、異なる温度で段階的に融解してもよい。融解速度および時間に制限はなく、徐々に融解してもよく、急速に融解してもよい。例えば、５～７０℃、好ましくは１５～４５℃の温度条件下に凍結したペプチドゲルを置くことで好適に融解を行い得る。

[0057] 融解手段としては、任意の適切な手段が選択され得る。融解手段の具体例としては、水浴、油浴、恒温槽等が挙げられる。

[0058] 上記のようにペプチドゲルを凍結融解することにより、ゲルを形成するペプチド分子間の種々の結合が切断されて、ゾルが得られる。凍結融解によって得られたゾルにおいては、ペプチド分子間の種々の結合が十分に切断されて粘度が著しく低下しているので、容易にコーティング対象物品の表面を均一にコーティングし得る。なお、ゾルの均一性をより高くする観点から、ゾル内に気泡が発生しない程度に振動を与えながら凍結したペプチドゲルを融解してもよく、また、得られたゾルに振動を与えてからコーティング工程に供してもよい。振動を与える方法としては、凍結したペプチドゲルまたはゾルを揺らすこと、これらに超音波を照射すること等が挙げられる。

[0059] Ｈ－３．コーティング工程

コーティングする方法としては、任意の適切な方法が採用され得る。具体例としては、ディスペンサー塗布方式、浸漬方式、バーコータ方式、遠心力によりゾルをコーティング対象物品の表面に展開する方式、コーティング対象物品を傾けることによりゾルを流動させてコーティング対象物品の表面に展開する方式が挙げられる。上記ゾルにおいては、ペプチド分子間の種々の結合が十分に切断されて粘度が著しく低下しており、また、ペプチド分子が十分に分散しているので、コーティング対象物品の表面に均一な層を形成し得る。

[0060] コーティング対象物品としては、任意の適切な物品が採用され得る。例えば、チューブ、ボトル等の容器、マルチウェルディッシュ、シャーレ等の細胞培養器具、スライドガラス等のプレートが挙げられる。コーティング対象物品は、ガラス、プラスチック、金属等の任意の材料から形成されている。

[0061] Ｈ－４．ゲル化工程

ゲルの再形成条件（温度、時間等）は、ペプチドゲルが再形成される限り制限はなく、ペプチドの種類および濃度等に応じて適切に設定され得る。本発明のペプチドは、自己組織化能を有するので、適切な条件に設定することにより、自己集合してゲルを自発的に再形成し得る。

[0062] ゲルの再形成条件としては、例えば、上記ペプチドゾルで表面をコーティ

ングされた物品を静置すればよい。静置温度は、好ましくは１５℃以上、さらに好ましくは２５～４５℃である。静置時間は、好ましくは１分以上、さらに好ましくは５分以上である。

[0063] 該ゲル化工程において再形成されたペプチドゲルの厚み、すなわち、物品表面のコーティング膜厚は、例えば１μｍ以上であり得、好ましくは１μｍ～１ｃｍであり得る。

実施例

[0064] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

[0065] [実施例１]

Ｆｍｏｃ固相合成法により、表１に記載の配列番号１のアミノ酸配列からなる自己組織化ペプチドを合成した。次いで、常法により、Ｎ末端をアセチル化し、Ｃ末端をアミド化して、修飾ペプチド１（［CH_3CO］－ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ－［NH_2］）を得た。

[0066] 得られた修飾ペプチド１を０．２、０．４、および０．６ｗ／ｖ％となるように、それぞれ０．１重量%炭酸水素ナトリウム溶液に溶解してペプチド溶液を得た。得られたペプチド溶液を、ｐＨ試験紙（商品名：ｐＨ Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ Ｐａｐｅｒｓ、Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｔｄ．製、測定範囲ｐＨ＝６．０～８．１、Ｃａｔ．Ｎｏ．２６２９９９０）を用いてｐＨ値を測定したところ、ｐＨは６．９～７．８の範囲内であった。該ペプチド溶液を商品名「Ｎｕｎｃ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｉｎｓｅｒｔｓ」（メンブレン直径：１０ｍｍ、ポアサイズ：８．０μｍ、メンブレン素材：ポリカーボネート）（Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ 社製、製品番号「Ｃａｔ． Ｎｏ： １３６８６２」）に３００μｌ入れ、２２℃で２時間静置することにより、ゲルを形成した。ゲルの厚みはおよそ２ｍｍであった。得られたゲルをＤＭＥＭで１２時間溶媒置換を行うことにより、０．２、０．４、および０．６ｗ／ｖ％のペプチドゲル１（液相：ＤＭＥＭ）を得た。得られた各濃度のペプチドゲ

ル１を以下の圧縮試験に供して、力学的強度を測定した。

[0067] ［圧縮試験］

２２℃の条件下、先端が球状（直径：３．２ｍｍ、曲率半径：１．６ｍｍ）であるステンレススチール製ジグ（ティー・エイ・インスツルメント社製）を取り付けた粘弾性測定装置（ティー・エイ・インスツルメント社製、製品番号「ＲＳＡ　ＩＩＩ」）を用いて、０．０５ｍｍ／ｓ（ｓ＝秒）の速度でゲルを圧縮することにより、力学的強度を測定した。

[0068] 圧縮試験の結果を図２に示す。図２は、ジグをサンプルに押し付けていった際に装置にかかる荷重と時間との関係を示し、近似直線の傾きが大きいほど力学的強度が高くなる。したがって、圧縮開始から初期（８～１０秒後まで）の測定値の近似直線の傾き（単位時間当たりの荷重の変化量）の絶対値をＬとした場合、Ｌの値が大きいほど力学的強度が高くなる。図２に示されるとおり、０．４ｗ／ｖ%のペプチドゲル１の上記圧縮試験での圧縮開始から約１０秒後までの単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌは、０．０４７６ｇ／ｓであった。

[0069] ０．４ｗ／ｖ%のペプチドゲル１をピンセットで挟んで持ち運んだところ、図３（ａ）に示すとおり、該ペプチドゲル１は挟持するために十分な強度を有しており、操作性に優れていた。

[0070] ［実施例２］

配列番号１のアミノ酸配列の代わりに配列番号２のアミノ酸配列を採用したこと以外は実施例１と同様にして、修飾ペプチド２（［CH_3CO］－ＲＬＤＬＲＬＬＲＬＤＬＲ－［NH_2］）を得た。修飾ペプチド１の代わりに修飾ペプチド２を用いたこと以外は実施例１と同様にして０．２、０．４、および０．６ｗ／ｖ%のペプチドゲル２（液相：ＤＭＥＭ）を形成した。

[0071] 得られたペプチドゲルについて、実施例１と同様にして力学的強度を測定した。結果を図４に示す。図４に示されるとおり、０．４ｗ／ｖ%のペプチドゲル２の上記圧縮試験における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌは、０．０４２３ｇ／ｓであった。

[0072] ０．４ｗ／ｖ％のペプチドゲル２をピンセットで挟んで持ち運んだところ、図３（ｂ）に示すとおり、該ペプチドゲル２は挟持するために十分な強度を有しており、操作性に優れていた。

[0073] [実施例３]

配列番号１のアミノ酸配列の代わりに配列番号３のアミノ酸配列を採用したこと以外は実施例１と同様にして、修飾ペプチド３（［CH_3CO］－ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲＬ－［NH_2］）を得た。修飾ペプチド１の代わりに修飾ペプチド３を用いたこと以外は実施例１と同様にして０．２および０．４ｗ／ｖ％のペプチドゲル３（液相：ＤＭＥＭ）を形成した。

[0074] 得られたペプチドゲルについて、実施例１と同様にして力学的強度を測定した。結果を図５に示す。図５に示されるとおり、０．４ｗ／ｖ％のペプチドゲル３の上記圧縮試験における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌは０．０３３６ｇ／ｓであった。

[0075] [比較例１]

配列番号１のアミノ酸配列の代わりに配列番号４のアミノ酸配列を採用したこと以外は実施例１と同様にして、修飾ペプチドｃ１（［CH_3CO］－ＡＳＡＲＡＤＡＲＡＤＡＲＡＳＡ－［NH_2］）を得た。修飾ペプチド１の代わりに修飾ペプチドｃ１を用いたこと以外は実施例１と同様にして０．２、０．４、および０．６ｗ／ｖ％のペプチドゲルｃ１（液相：ＤＭＥＭ）を形成した。

[0076] 得られたペプチドゲルについて、実施例１と同様にして力学的強度を測定した。結果を図６に示す。図６に示されるとおり、０．４ｗ／ｖ％のペプチドゲルｃ１の上記圧縮試験における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌは０．０１４３ｇ／ｓであった。

[0077] ０．４ｗ／ｖ％のペプチドゲルｃ１をピンセットで挟んで持ち運んだところ、図３（ｃ）に示すとおり、該ペプチドゲルｃ１は力学的強度が不十分であり、操作性の点で問題があった。

[0078] [比較例２]

配列番号１のアミノ酸配列の代わりに配列番号５のアミノ酸配列を採用したこと以外は実施例１と同様にして、修飾ペプチドｃ２（［CH_3CO］－ＲＡＳＡＲＡＤＡＲＡＳＡＲＡＤＡ－［NH_2］）を得た。修飾ペプチド１の代わりに修飾ペプチドｃ２を用いたこと以外は実施例１と同様にして０．２および０．４ｗ／ｖ%のペプチドゲルｃ２（液相：ＤＭＥＭ）を形成した。

[0079] 得られたペプチドゲルについて、実施例１と同様にして力学的強度を測定した。結果を図７に示す。図７に示されるとおり、０．４ｗ／ｖ%のペプチドゲルｃ２の上記圧縮試験における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌは、０．０１６７g／sであった。

[0080] ［実施例４］

配列番号１のアミノ酸配列の代わりに配列番号１２のアミノ酸配列を採用したこと以外は実施例１と同様にして、修飾ペプチド４（［CH_3CO］－ＲＧＤＮＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ－［NH_2］）を得た。修飾ペプチド１の代わりに修飾ペプチド４を用いたこと以外は実施例１と同様にして０．２、０．４、および０．６ｗ／ｖ%のペプチドゲル４（液相：ＤＭＥＭ）を形成した。

[0081] 得られたペプチドゲルについて、実施例１と同様にして力学的強度を測定した。結果を図８に示す。図８に示されるとおり、０．４ｗ／ｖ%のペプチドゲル４の上記圧縮試験における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌは０．０６１８ｇ／sであった。

[0082] ［表1］

アミノ酸配列		
実施例1	n－RLDLRLALRLDLR－c	配列番号:1
実施例2	n－RLDLRLLLRLDLR－c	配列番号:2
実施例3	n－RLDLRLALRLDLRL－c	配列番号:3
実施例4	n－RGDNRLDLRLALRLDLR－c	配列番号:12
比較例1	n－RASARADARADARASA－c	配列番号:4
比較例2	n－RASARADARASARADA－c	配列番号:5

[0083] 図２および４～８に示すとおり、本発明のペプチドは、比較例の自己組織化ペプチドに比べて高い力学的強度を有するペプチドゲルを形成し得ることがわかる。また、図３に示すとおり、本発明のペプチドゲルは、高い力学的強度を有するので、操作性に極めて優れることがわかる。さらに、本発明のペプチドは、低いペプチド濃度で十分な力学的強度のペプチドゲルを形成し得るので、コスト的にも有利である。

[0084] [実施例５]

マウス筋芽細胞（Ｌ６）を２．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍｌの細胞濃度で含む細胞懸濁液と、上記修飾ペプチド１を１．０ｗ／ｖ%で含むペプチド水溶液とを、容積比３：２（細胞懸濁液：ペプチド水溶液）で混合した。得られた混合物（細胞濃度：１．２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍｌ、ペプチド濃度：０．４ｗ／ｖ%）をセルカルチャーインサート（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ社製、製品番号「３５３０９６」）に入れて室温でおよそ１分間静置することにより、ペプチドゲルを形成させた。該ゲルをセルカルチャーインサートごと１ｍＬの１０%子牛血清含有ＤＭＥＭ培地が入った組織培養用２４ウェルプレート（ＡＧＣテクノグラス社製、製品番号「３８２０－０２４」）のウェルにセットした。次いで、５%CO_2存在下３７℃インキュベーターで細胞培養を行った。培地交換は培養開始から２日後に一度だけ行った。培養開始から、１、２、および４日後にゲルを取り出して、商品名「ＣｙＱＵＡＮＴ（登録商標）　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ　＊ｆｏｒ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎ　ｃｕｌｔｕｒｅ＊　＊１０００　ａｓｓａｙｓ＊」（インビトロジェン社製、製品番号「Ｃ７０２６」）を用いてＤＮＡ定量を行い、細胞増殖率を算出した。細胞増殖率は、培養開始直後を１００%とした場合に、１日後では１５０%、２日後では１８０%、４日後では３１０%であり、日数の経過に伴って細胞数が増加していた（算出結果はｎ＝３の平均）。

[0085] [実施例６]

修飾ペプチド１の代わりに修飾ペプチド２を用いたこと以外は実施例５と

同様にして、細胞培養およびＤＮＡ定量を行った。細胞増殖率を算出したところ、細胞増殖率は、培養開始直後を１００％とした場合に、１日後では１４０％、２日後では１６０％、４日後では２５０％であり、日数の経過に伴って細胞数が増加していた（算出結果はｎ＝３の平均）。

[0086] ［実施例７］

上記修飾ペプチド１を炭酸ナトリウム溶液に溶解し、０．５ｗ／ｖ％のペプチド水溶液（炭酸ナトリウムの終濃度：２．７５ｍＭ）を調製した。該ペプチド水溶液にオートクレーブ装置（三洋電機社製、製品番号「ＭＬＳ３０２０」）を用いて、１２１℃、２０分の滅菌処理を行い、ペプチドゲルを得た。該ゲルとマウスＮＩＨ３Ｔ３細胞をＤＭＥＭ培地に懸濁した細胞懸濁液とを、容積比２：１（ゲル：細胞懸濁液）でピペッティングにより均一となるように混合した。得られた細胞 - ゲル混合物をセルカルチャーインサート（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ社製、製品番号「３５３０９６」）５個に１００μＬずつ加え、該セルカルチャーインサートを１ｍＬの１０％子牛血清含有ＤＭＥＭ培地が入った組織培養用２４ウェルプレート（ＡＧＣテクノグラス社製、製品番号「３８２０－０２４」）のウェルにセットした。このとき、細胞 - ゲル混合物中の細胞濃度は、１．４５×10^5ｃｅｌｌ／１００μＬであった。次いで、５％CO_2存在下３７℃インキュベーターで細胞培養を行った。培養開始から０日後（２時間後）、１日後、３日後、および５日後に商品名「Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ　８」（同仁化学社製）を使用して細胞増殖率を測定した。その結果、図９に示すとおり、培養日数の経過に伴って細胞増殖率が増加していた。

[0087] 上記細胞増殖率測定の具体的な手順は次のとおりである。すなわち、ウェル内の培地１ｍＬを新しい培地１ｍＬに交換し、Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ　８溶液１００μＬを加え、該ウェル内にセルカルチャーインサートを入れて３７℃で２時間インキュベートした。インキュベート後、セルカルチャーインサート内のゲル上に浸透してきた培地１００μＬを９６ウェルプレートに移し、プレートリーダーを用いて４５０ｎｍにおける該培地の吸

光度を測定した。培養開始から０日後のサンプルの吸光度を１００として各培養日数における細胞増殖率を求めた。

[0088] 実施例５～７の結果からわかるとおり、本発明のペプチドゲルは、生体適合性を有しており、細胞培養用基材として好適に使用され得る。

[0089] ［実施例８］

上記修飾ペプチド１を炭酸ナトリウム溶液に溶解し、０．５ｗ／ｖ％のペプチド水溶液（炭酸ナトリウムの終濃度：４．５ｍＭ）を調製した。該ペプチド水溶液のｐＨは、中性領域であった。該ペプチド水溶液にオートクレーブ装置（三洋電機社製、製品番号「ＭＬＳ３０２０」）を用いて１２１℃、２０分の滅菌処理を行った。滅菌処理前後のペプチド水溶液に含まれるペプチド分子の質量を飛行時間型質量分析装置（Ｂｒｕｋｅｒ社製、製品番号「ａｕｔｏｆｌｅｘＩＩＩ」）を用い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ）により調べた。結果を図１０に示す。

[0090] ［比較例３］

修飾ペプチド１のペプチド水溶液の代わりに商品名「ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ™」（スリー・ディー・マトリックス社製）を用いたこと以外は実施例８と同様にして滅菌処理および質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ）を行った。結果を図１１に示す。

[0091] 図１０に示すとおり、本発明のペプチドは滅菌処理によって実質的に分解されない。したがって、本発明のペプチドに滅菌処理を行うことにより、無菌状態とすることができる。一方、図１１に示すとおり、商品名「ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ™」（スリー・ディー・マトリックス社製）は、滅菌処理によってペプチドの分解が生じていることがわかる。これは、商品名「ＰｕｒａＭａｔｒｉｘ™」（スリー・ディー・マトリックス社製）が酸性のペプチド水溶液であるためと推測される。

[0092] ［実施例９］

上記修飾ペプチド１を炭酸ナトリウム溶液に溶解し、０．８ｗ／ｖ％のペ

プチド水溶液（炭酸ナトリウムの終濃度：４．５ｍＭ）を調製した。得られたペプチド水溶液を２２℃で２時間静置してペプチドゲルを形成した。該ゲルを無造作にガラス製シャーレ（φ６ｃｍ）に移した。このときの写真を図１２（ａ）に示す。図１２（ａ）に示されるとおり、ゲルには気泡が入っており、硬いためにシャーレを均一にコーティングすることができなかった。

[0093] 上記シャーレをゲルごと－２０℃の冷凍庫に入れてゲルを凍結させた。凍結したゲルの写真を図１２（ｂ）に示す。その後、シャーレを冷凍庫から出し、室温条件下でシャーレを揺らしながらゲルを融解し、得られたゾルをシャーレの底面全体に展開した。その状態でシャーレを静置することにより、ゲルを再形成させた。これにより、ペプチドゲルで底面全体が均一にコーティングされたシャーレを得た。該シャーレの写真を図１２（ｃ）に示す。

[0094] ［実施例１０］

ガラス製シャーレの代わりにスライドガラスを用いたこと以外は実施例９と同様にして、ペプチドゲルが表面全体に均一にコーティングされたスライドガラスを得た。ゲルをスライドガラスに移した時の写真、凍結したゲルの写真、およびペプチドゲルで表面全体が均一にコーティングされたスライドガラスの写真をそれぞれ、図１３（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）に示す。

産業上の利用可能性

[0095] 本発明の自己組織化ペプチド等は、再生医療、ドラッグデリバリーシステム、化粧品、人工硝子体、止血剤、美容整形用注射剤、骨充填、関節潤滑剤、湿潤用保水材等に適用され得る。

配列表フリーテキスト

[0096] 配列番号１は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号２は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号３は、本発明の修飾ペプチドである。

配列番号４は、本発明の自己組織化ペプチドではないペプチドである。

配列番号５は、本発明の自己組織化ペプチドではないペプチドである。

配列番号６は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号７は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号８は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号９は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号１０は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号１１は、本発明の自己組織化ペプチドである。

配列番号１２は、本発明の修飾ペプチドである。

請求の範囲

[請求項1] 下記のアミノ酸配列からなる自己組織化ペプチド。

アミノ酸配列：$a_1b_1c_1b_2a_2b_3db_4a_3b_5c_2b_6a_4$

（該アミノ酸配列中、a_1～a_4は、塩基性アミノ酸残基であり；b_1～b_6は、非電荷極性アミノ酸残基および／または疎水性アミノ酸残基であり、ただし、そのうちの少なくとも５個は、疎水性アミノ酸残基であり；c_1およびc_2は、酸性アミノ酸残基であり；ｄは、疎水性アミノ酸残基である。）

[請求項2] 前記アミノ酸配列中、b_3およびb_4が、疎水性アミノ酸残基である、請求項１に記載の自己組織化ペプチド。

[請求項3] 前記アミノ酸配列中、b_1～b_6がすべて、疎水性アミノ酸残基である、請求項１または２に記載の自己組織化ペプチド。

[請求項4] 前記アミノ酸配列中、b_1～b_6が、それぞれ独立してアラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、またはイソロイシン残基である、請求項１から３のいずれかに記載の自己組織化ペプチド。

[請求項5] 前記アミノ酸配列中、ｄがアラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、またはイソロイシン残基である、請求項１から４のいずれかに記載の自己組織化ペプチド。

[請求項6] ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ（配列番号１）、ＲＬＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号２）、ＲＡＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ（配列番号６）、ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＡＲ（配列番号７）、ＲＡＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号８）、ＲＡＤＬＲＬＬＬＲＬＤＡＲ（配列番号９）、ＲＬＤＬＲＡＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号１０）、または、ＲＬＤＬＲＬＬＡＲＬＤＬＲ（配列番号１１）のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項１から５のいずれかに記載の自己組織化ペプチド。

[請求項7] ＲＬＤＬＲＬＡＬＲＬＤＬＲ（配列番号１）、または、ＲＬＤＬＲＬＬＬＲＬＤＬＲ（配列番号２）のアミノ酸配列からなるペプチドで

ある、請求項１から６のいずれかに記載の自己組織化ペプチド。

[請求項8] 請求項１から７のいずれかに記載の自己組織化ペプチドのＮ末端アミノ基および／またはＣ末端カルボキシル基が修飾されたペプチドであって、自己組織化能を有する修飾ペプチド。

[請求項9] 前記Ｎ末端アミノ基および／またはＣ末端カルボキシル基に、ＲＧＤを含むアミノ酸配列が付加されている、請求項８に記載の自己組織化能を有する修飾ペプチド。

[請求項10] 請求項１から７のいずれかに記載の自己組織化ペプチドおよび／または請求項８もしくは９に記載の修飾ペプチドを含む水溶液から形成される、ペプチドゲル。

[請求項11] 前記水溶液がさらに添加物を含む、請求項１０に記載のペプチドゲル。

[請求項12] 前記添加物が、ｐＨ調整剤、アミノ酸類、ビタミン類、糖類、多糖類、アルコール類、多価アルコール類、色素、生理活性物質、酵素、抗体、ＤＮＡ、およびＲＮＡからなる群より選択される少なくとも一つである、請求項１１に記載のペプチドゲル。

[請求項13] ２２℃の温度条件下で、先端が直径３．２ｍｍ、曲率半径１．６ｍｍの球状であるジグを用い、０．０５ｍｍ／ｓの圧縮速度で行った圧縮試験において、圧縮開始から８～１０秒後までの測定値の近似直線における単位時間当たりの荷重の変化量の絶対値Ｌ(ｇ／s)が０．０３ｇ／s以上である、請求項１０から１２のいずれかに記載のペプチドゲル。

[請求項14] 請求項１から７のいずれかに記載の自己組織化ペプチド、請求項８または９に記載の修飾ペプチド、および請求項１０から１３のいずれかに記載のペプチドゲルからなる群より選択される少なくとも一つを含む、細胞培養用基材。

[請求項15] 請求項１から７のいずれかに記載の自己組織化ペプチドおよび／または請求項８もしくは９に記載の修飾ペプチドを、加圧条件下、１０

０℃以上で滅菌する工程を含む、無菌ペプチドの製造方法。

[請求項16] 請求項１０から１３のいずれかに記載のペプチドゲルを凍結する工程、

該凍結物を融解してペプチドゾルを得る工程、

コーティング対象物品の表面の少なくとも一部を該ペプチドゾルでコーティングする工程、および

該ペプチドゾルからペプチドゲルを再形成する工程

を含む、ペプチドゲルでコーティングされた物品の製造方法。