

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6002352号
(P6002352)

(45) 発行日 平成28年10月5日 (2016. 10. 5)

(24) 登録日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/30	(2015. 01)	A 6 1 K 35/30
A 6 1 K 8/98	(2006. 01)	A 6 1 K 8/98
A 6 1 P 17/14	(2006. 01)	A 6 1 P 17/14
A 6 1 Q 7/00	(2006. 01)	A 6 1 Q 7/00
A 6 1 K 38/22	(2006. 01)	A 6 1 K 37/24

請求項の数 13 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-508867 (P2016-508867)
(86) (22) 出願日	平成26年4月16日 (2014. 4. 16)
(65) 公表番号	特表2016-516811 (P2016-516811A)
(43) 公表日	平成28年6月9日 (2016. 6. 9)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/003324
(87) 国際公開番号	W02014/171746
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014. 10. 23)
審査請求日	平成27年12月4日 (2015. 12. 4)
(31) 優先権主張番号	10-2013-0043706
(32) 優先日	平成25年4月19日 (2013. 4. 19)
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)

(73) 特許権者	510273880
	コリア ユニバーシティ リサーチ アン ド ビジネス ファウンデーション KOREA UNIVERSITY RE SEARCH AND BUSINESS FOUNDATION 大韓民国、136-701 ソウル、ソン ブクダ、アナムーロ 145
(74) 代理人	100078282
	弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413
	弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674
	弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経幹細胞抽出物を含有する発毛促進または脱毛防止用組成物及びこれの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経幹細胞抽出物を含有する発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 2】

前記神経幹細胞は、脳の脳室領域 (ventricular zone) から抽出された神経幹細胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 3】

前記神経細胞抽出物は、15 ~ 25 % (v / v) の濃度で含まれることを特徴とする請求項 1 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 4】

前記神経幹細胞抽出物は、毛乳頭細胞で成長因子、レプチン (leptin) 及び Shh (Sonic hedgehog) の発現を促進させることを特徴とする請求項 1 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 5】

前記成長因子は、血管内皮成長因子 (VEGF)、インシュリン様成長因子 (IGF)、肝細胞成長因子 (HGF)、及びケラチノサイト成長因子 (KGF) からなる群で選択される一つ以上を含むことを特徴とする請求項 4 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 6】

前記神経幹細胞抽出物は、毛乳頭細胞で TGF-β1 または IL-6 の発現を抑制することを特徴とする請求項 1 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

10

20

【請求項 7】

前記神経幹細胞抽出物は、毛嚢内幹細胞を活性化させることを特徴とする請求項 1 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 8】

前記幹細胞の活性化は、BMP 2、BMP 4 または BMP 6 の発現抑制及び Tmeff 1 または TGF-2 の発現増加を介して行われることを特徴とする請求項 7 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

【請求項 9】

前記組成物は、薬学組成物であることを特徴とする請求項 1 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物。

10

【請求項 10】

請求項 1 から請求項 9 のいずれかに記載の組成物を有効成分として含有する脱毛治療剤。

【請求項 11】

(a) 神経幹細胞を培養する工程及び (b) 前記神経幹細胞培養液から神経幹細胞抽出物を分離する工程を含む、発毛促進または脱毛防止用組成物の製造方法。

【請求項 12】

前記工程 (a) の神経幹細胞は、脳の脳室領域 (ventricular zone) から抽出された神経幹細胞であることを特徴とする請求項 11 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物の製造方法。

【請求項 13】

20

前記工程 (a) は、N-2 添加剤、ヘパリン、繊維芽細胞成長因子 (bFGF)、表皮成長因子 (EGF)、及び白血病抑制因子 (LIF) が含まれたヒト神経球培養培地 (human neurosphere culture media) で 10 ~ 14 日間培養後、不滅化して得た細胞を DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS (fetal bovine serum)、及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシンが含まれた非誘導性培地で培養することを特徴とする請求項 11 に記載の発毛促進または脱毛防止用組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経幹細胞抽出物を含有する発毛促進または脱毛防止用組成物及びこれの製造方法に関する。より詳細には、本発明は、外胚葉由来神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物の新しい用途に関し、ヒト脳の脳室領域 (ventricular zone) から抽出された神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を培養して製造された神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を発毛促進または脱毛防止用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

40

髪の毛は、一定の毛周期 (Hair cycle) を持って、毛乳頭周囲にある毛母細胞 (keratinocyte) が分裂増殖する期間を成長期といい、毛髪の成長が止まって毛乳頭から分離する時期である退化期を経て毛母細胞が成長せずにいた後、一定期間後抜ける休止期を経る。毛周期は、このような成長期、退化期、休止期、及び成長期の過程を繰り返すことになる。通常成人の毛髪成長期は、個人差はあるが、一般に男性が 3 ~ 5 年、女性が 4 ~ 6 年であり、毛髪の約 15% が退化期と休止期であるといわれている。ヒトの毛髪は、各々独立した成長周期を持って、一方では抜けて、他方では生えて全体的に同じ毛髪数を維持して、これを生理的自然脱毛という。しかし、正常な成長周期の休止期の他にも、疾病、ヘア製品 (ジェル、ワックスなど)、ストレスなどで脱毛現象が発生したりもするが、このような場合は、原因が除去されると再び回復する。

50

【0003】

ハゲは髪の毛が抜けて生えないのではなく次第に細くなって細い毛になることであり、進行されながら毛根に存在する毛乳頭が小さくなる。毛乳頭が小さくなれば、髪の毛の太さも細くなると同時に毛周期も短くなって、新しく生えてきた毛はさらに細くなる。ハゲが進行し続けると、髪の毛は細い毛に変わり、毛周期はさらに短くなって少し育った後抜ける。また、自己免疫疾患で発生するといわれている円形脱毛症と内分泌疾患、栄養不足、薬、出産など、身体的、精神的ストレス後発生する一時的な脱毛とは異なり、よく知っているハゲは遺伝する傾向があって、頭がはげる程度も様々であり、体内血中男性ホルモン（アンドロゲン、androgen）と関係があると知られている。

【0004】

10

現在脱毛初期には局所塗布剤であるミノキシジルと経口用薬剤であるプロペシア（finasteroid成分）を使えば、それ以上の進行はある程度遅らせることができると知られているが、すでに進行された脱毛に対しては正常に回復するのに困難があり、このような場合は、毛髪移植を検討することができる。毛髪移植は、ホルモンの感受性が少なく、脱毛の影響が少ない耳の上側部分の横髪と後頭部の毛髪を平均1000～3000毛前後で切開法（または、非切開法）を利用して採取して、これを移植する方法があるが、これも回数に制限がある。

【0005】

現在市販されている製品は、脱毛防止効果は知られているが、発毛と関連しては僅かな効果を示す。また、使用時中断すると、再び問題が生じて、コストの側面でも負担になる。

20

【0006】

最近遺伝子を利用した脱毛治療方法及び幹細胞を利用した脱毛治療方法が開発されている。本発明の背景になる技術として、大韓民国登録特許第10-0771171号（2007年10月29日）には、毛嚢幹細胞を分離、増殖して、毛嚢細胞に分化させる方法及びハゲ治療用組成物について記載されていて、大韓民国公開特許第10-2008-0097593号（2008年11月06日）には、脂肪組織由来幹細胞及び毛嚢細胞を適切に混合して組成された細胞治療剤に対して記載されている。また、大韓民国登録特許第10-1218101号（2013年01月03日）には、羊水内胎児由来中間葉幹細胞の培養液を有効性分として含む発毛促進または脱毛防止用組成物に関して記載されている。しかし、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を利用した優秀な効果の発毛促進または脱毛防止用組成物に対しては知られていない。

30

【0007】

そこで、本発明者等は、ヒトの毛乳頭細胞（human dermal papilla cells；hDPCs）に神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を適用して、その特徴を解明して、in vivoでC57BL/6マウスを利用して発毛促進または脱毛防止効果を確認することによって本発明を完成した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

40

【特許文献1】韓国登録特許第10-0771171号（2007年10月29日）

【特許文献2】大韓民国公開特許第10-2008-0097593号（2008年11月06日）

【特許文献3】大韓民国登録特許第10-1218101号（2013年01月03日）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の目的は、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を含有する発毛促進または脱毛防止用組成物を提供することにある。

本発明の他の目的は、神経幹細胞を利用した発毛促進または脱毛防止用組成物を製造する

50

方法を提供するところにある。

本発明のさらに他の目的及びメリットは、下記の発明の詳細な説明、請求範囲及び図面によってより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物の全体タンパク質含有量をBradford assayを介して確認した結果である。

【図2A】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時細胞毒性及び細胞形態をWST-1分析及び位相差顕微鏡で確認した結果である。

【図2B】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時細胞毒性及び細胞形態をWST-1分析及び位相差顕微鏡で確認した結果である。

10

【図3】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時毛乳頭細胞の増殖をWST-1分析で確認した結果である。

【図4A】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時様々な成長因子(VEGF、IGF、HGF、KGF)及びサイトカイン(Wnt5a、BMP2、TGF- β 2等)発現が増加することをqRT-PCR及びRT-PCRで確認した図面である。

【図4B】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時様々な成長因子(VEGF、IGF、HGF、KGF)及びサイトカイン(Wnt5a、BMP2、TGF- β 2等)発現が増加することをqRT-PCR及びRT-PCRで確認した図面である。

20

【図4C】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時様々な成長因子(VEGF、IGF、HGF、KGF)及びサイトカイン(Wnt5a、BMP2、TGF- β 2等)発現が増加することをqRT-PCR及びRT-PCRで確認した図面である。

【図4D】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時様々な成長因子(VEGF、IGF、HGF、KGF)及びサイトカイン(Wnt5a、BMP2、TGF- β 2等)発現が増加することをqRT-PCR及びRT-PCRで確認した図面である。

【図4E】本発明による神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞に処理時様々な成長因子(VEGF、IGF、HGF、KGF)及びサイトカイン(Wnt5a、BMP2、TGF- β 2等)発現が増加することをqRT-PCR及びRT-PCRで確認した図面である。

30

【図5A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物によって毛髪 of 成長期を誘導するレプチン(leptin)とサイトカインであるShh(Sonic hedgehog)の発現量が増加することをqRT-PCRで確認した図面である

【図5B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物によって毛髪 of 成長期を誘導するレプチン(leptin)とサイトカインであるShh(Sonic hedgehog)の発現量が増加することをqRT-PCRで確認した図面である

【図6A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物によって毛髪 of 退化期を誘導するTGF- β 1(Transforming growth factor β 1)の発現とIL-6の発現が阻害されることをqRT-PCRで確認した図面である。

40

【図6B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物によって毛髪 of 退化期を誘導するTGF- β 1(Transforming growth factor β 1)の発現とIL-6の発現が阻害されることをqRT-PCRで確認した図面である。

【図7A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに一定期間塗布時発毛が促進されることを確認した写真である。

【図7B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウ

50

スに一定期間塗布時発毛が促進されることを確認した写真である。

【図 8 A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに一定期間塗布後発毛が促進されることを毛の長さ及び重量で確認した図及びグラフである。

【図 8 B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに一定期間塗布後発毛が促進されることを毛の長さ及び重量で確認した図及びグラフである。

【図 8 C】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに一定期間塗布後発毛が促進されることを毛の長さ及び重量で確認した図及びグラフである。

【図 9 A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を塗布後毛穴の成長が誘導されたことを H & E (H e m a t o x y l i n a n d e o s i n) を介して確認した結果である。

【図 9 B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を塗布後毛穴の成長が誘導されたことを H & E (H e m a t o x y l i n a n d e o s i n) を介して確認した結果である。

【図 10 A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後細胞の成長が増加したことを組織免疫蛍光法 (I m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) を介して確認した結果である。

【図 10 B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後細胞の成長が増加したことを組織免疫蛍光法 (I m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) を介して確認した結果である。

【図 11】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後組織内で毛乳頭細胞のマーカーである A l k a l i n e p h o s p h a t a s e (A k p) の発現量が増加することを q R T - P C R で確認した結果である。

【図 12】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後組織毛穴内幹細胞の分化を抑制する B M P f a m i l y の発現量が減少することを q R T - P C R で確認した結果である。

【図 13 A】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後組織毛穴内幹細胞の分化を抑制する B M P の発現を抑制する T m e f f 1 の増加及び前記 T m e f f 1 の発現を増加させる T G F β - 2 の増加を q R T - P C R で確認した結果である。

【図 13 B】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後組織毛穴内幹細胞の分化を抑制する B M P の発現を抑制する T m e f f 1 の増加及び前記 T m e f f 1 の発現を増加させる T G F β - 2 の増加を q R T - P C R で確認した結果である。

【図 14】本発明による神経幹細胞の培養液及び神経幹細胞抽出物を、毛を除去したマウスに塗布後組織毛穴内 B M P s の減少による幹細胞 (C D 3 4 +) の分化程度を組織免疫蛍光法 (I m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) を介して確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

一観点において、本発明は、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を含有する発毛促進または脱毛防止用組成物に関する。

【0012】

本発明で、前記組成物を製造するための神経幹細胞は、その種類に制限されない。好ましくは胎児から由来した成体幹細胞であり、本発明の具体的な実施例では胎児脳の脳室領域 (v e n t r i c u l a r z o n e) から抽出された神経幹細胞を利用して神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を製造した。

【0013】

本発明で「神経幹細胞培養液」とは、外胚葉幹細胞の一種である神経幹細胞を継代培養

10

20

30

40

50

して収得した培地内に含まれた構成成分を含む物質で、「神経幹細胞抽出物」とは、外胚葉幹細胞の一種である神経幹細胞を継代培養して神経幹細胞培養液を収得して遠心分離して上澄み液をろ過して、この時分離した沈殿物をホモジナイザー (homogenizer) で均質化して製造された混合物を遠心分離して得た上澄み液で収得した細胞内に含まれた構成成分を含む物質である (実施例 1 参照)。

【0014】

本発明で神経細胞抽出物は、細胞毒性を示さない範囲の有効濃度で 10 ~ 30 % (v/v) で含まれて、好ましくは 15 ~ 25 % (v/v) であり、最も好ましくは 20 % (v/v) で含まれる。

【0015】

本発明の具体的な実施例では、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物が発毛促進機能を活性化させるかを確認するために、神経幹細胞培養液 (Conditioned medium; CM) 及び抽出物 (Extract; Ext.) から得た全体タンパク質を Bradford assay を介して確認した (図 1)。

【0016】

本発明の神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞 (Dermal Papilla cells) に 3 日間処理後、細胞毒性を WST - 1 分析で、細胞形態を位相差顕微鏡を介して確認した (図 2 A ~ 図 2 B)。

【0017】

本発明の神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を毛乳頭細胞 (Dermal Papilla cells) に処理後、24 時間単位で最大 72 時間毛乳頭細胞の増殖を WST - 1 分析を介して確認した (図 3)。

【0018】

本発明の神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物は、細胞内の様々な成長因子及びサイトカインを含んで発毛促進機能を行って、好ましくは発毛促進を決める毛乳頭細胞 (Dermal Papilla cells) で毛髪成長に關与する様々な成長因子 (growth factor) 分泌を誘導することを確認した (図 4 A ~ 図 4 E)。前記毛髪成長因子は、血管内皮成長因子 (VEGF)、インシュリン様成長因子 (IGF)、肝細胞成長因子 (HGF)、及びケラチノサイト成長因子 (KGF) からなる群で選択される一つ以上を含む。

【0019】

本発明の神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物は、細胞内の様々な成長因子及びサイトカインを含んで発毛促進機能を行って、好ましくは発毛促進を決める毛髪の成長期を誘導するサイトカインである Shh (Sonic hedgehog) の発現を促進させることを確認した (図 5 A 及び図 5 B)。

【0020】

本発明の神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物は、対照群とは異なり毛髪の退化期を誘導する TGF - β 1 (Transforming growth factor β 1) の発現を阻害させることを確認した (図 6 A 及び図 6 B)。

【0021】

本発明の具体的な実施例では、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物が発毛促進機能を活性化させるかを確認するために、毛を除去した C57BL/6 マウスの背中に神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を種々の濃度で処理した。その結果、対照群 (Mock) とは異なって、神経幹細胞培養液 (Conditioned medium; CM) 処理群及び神経幹細胞抽出物 (Extract; Ext.) 処理群で発毛の増加が誘導されることを確認した (図 7 A 及び図 7 B)。

【0022】

神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物処理群で対照群とは異なり毛髪の成長期が誘導されて、全般的な発毛の長さや発毛の量も増加することを確認した (図 8 A ~ 図 8 C)。

【0023】

神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物処理群で対照群とは異なり同じ時間の間活性化
する毛穴の数が増えるのを確認した(図9A及び図9B)。

【0024】

対照群と神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物処理群で細胞増殖を示すマーカーで
あるKi-67を確認した結果、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を塗布した群
で細胞増殖が活性化して、細胞死滅も起きないことを確認した(図10A及び図10B)。
。

【0025】

また、対照群と神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物処理群で組織内で毛乳頭細胞
のマーカーであるalkaline phosphatase(Akp)mRNA発現量
の増加を確認した(図11)。

10

【0026】

対照群と神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物処理群で毛穴内幹細胞(bulge
stem cells)の分化を抑制して毛髪成長を抑制する物質として知られるBMP
P(Bone morphogenetic proteins) familyの発現量
を確認した結果、対照群(Mock)及び神経幹細胞培養液(Conditioned
medium; CM)処理群とは異なり神経幹細胞抽出物(Extract; Ext.)
処理群で発現量が減少することを確認した(図12)。

【0027】

対照群と神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物処理群でBMPs発現を抑制するT
meff1及びTmeff1を増加させるTGFβ-2(Transforming g
rowth factor bata 2)のmRNA発現量を確認した結果、神経幹
細胞抽出物(Extract; Ext.)処理群でTmeff1及びTGFβ-2の発現量
が増加することを確認した(図13A及び図13B)。

20

【0028】

対照群と神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物処理群でBMPsの発現減少による
幹細胞(CD34+)の分化程度を確認した結果、神経幹細胞抽出物(Extract;
Ext.)処理群で毛嚢内幹細胞が活性化することを確認した(図14)。

【0029】

本発明の神経幹細胞培養のための培地は、当業界に知られた基本培地を制限なしに用い
ることができる。基本培地は人為的に合成して製造することができ、商業的に製造された
培地を用いることもできる。商業的に製造される培地としては、例えば、DMEM(Du
lbecco's Modified Eagle's Medium)、MEM(Min
imal Essential Medium)、BME(Basal Medium
Eagle)、RPMI 1640、F-10、F-12、a-MEM(a-Minim
al essential Medium)、G-MEM(Glasgow's Min
imal Essential Medium)及びIsocove's Modifi
ed Dulbecco's Mediumなどが挙げられるが、これらに限定せず、D
MEM培地であってもよい。

30

【0030】

前記基本培地には0.01~15%(v/v)のFBSを含むことが好ましく、本発明
の具体的な実施例では、DMEM培地に10% FBSが添加された培地で培養された神
経幹細胞を利用して毛髪成長効果を測定した。

40

【0031】

本発明において、「発毛促進または脱毛防止用組成物」とは、前記神経幹細胞培養液ま
たは神経幹細胞抽出物を含む組成物として、その剤形はいずれの形態でも可能である。こ
のような剤形の例として、前記発毛促進または脱毛防止用組成物を利用して製造された形
態は、溶液、ゲル、クリーム類、ローション類、パウダー、化粧水類、ファンデーション
類及び個体化した石鹸類などであってもよい。本発明の目的を達成するために、このよう
な剤形のうちいずれの形態でも製造されて商用化できるが、前記例に限定されない。本発

50

明の発毛促進または脱毛防止用組成物に含まれる成分は、有効成分以外に発毛促進または脱毛防止用組成物に通常利用される成分を含み、例えば抗酸化剤、安定化剤、溶解化剤、ビタミン、顔料及び香料のような通常の補助剤、そして担体を含んでもよい。

【0032】

さらに、本発明は、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物を含有する発毛促進または脱毛防止用薬学組成物を提供することができる。

【0033】

本発明の薬学組成物に含まれる薬学的に許容される担体は、製剤時に通常利用されるもので、ラクトース、テクストロース、スクロース、ソルピトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルジネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微細結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及びミネラルオイルなどを含むが、これらに限定されるのではない。本発明の薬学組成物は、前記成分以外に潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などをさらに含んでもよい。適する薬学的に許容される担体及び製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995) に詳細に記載されている。

【0034】

本発明の薬学組成物の適切な投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、性別、疾病症状の程度、食べ物、投与時間、投与経路、排泄速度及び反応感応性といった要因によって多様であるが、通常の熟練した医師は、目的する治療に効果的な投与量を容易に決定及び処方することができる。一方、本発明の薬学組成物の投与量は、これに限定されないが、1日当たり0.01～2000mg/kg(体重)であってもよい。

【0035】

本発明の薬学組成物は、経口または非経口で投与できて、非経口で投与される場合、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、経皮投与などで投与することができる。本発明の薬学組成物は、適用される疾患の種類によって投与経路が決定されることが好ましい。例えば、本発明の薬学組成物は、発毛促進または脱毛の予防及び治療に用いられるので、皮膚に局所的に適用される方式で投与されることが好ましい。

【0036】

本発明の薬学組成物は当該発明が属する技術分野で通常の知識を有する者が容易に実施できる方法により、薬学的に許容される担体及び/または、賦形剤を利用して製剤化することによって、単位容量形態で製造されるか、または多用量容器内に内含させて製造されることができる。この時、剤形は、オイルまたは水性媒質中の溶液、懸濁液または乳化液形態やエキス剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤形態であってもよく、分散剤または安定化剤を追加的に含んでもよい。

【0037】

本明細書で用いられる用語「発毛促進」または「脱毛防止」とは、当業界で利用される他の用語養毛または育毛促進を含む意味である。

【0038】

本発明の組成物が適用されることができる部位は、頭皮だけでなく発毛を必要とする身体部位であればどこにも適用することができる。例えば、外傷による傷跡で毛髪または毛が損傷した部位または単に美容効果を目的とする広い額またはM型額、まつげまたは眉毛及び無毛症の状態好転にも用いることができる。

【0039】

他の観点において、本発明は、(a)神経幹細胞を培養する工程及び(b)前記神経幹細胞培養液から神経幹細胞抽出物を分離する工程を含む、発毛促進または脱毛防止用組成物の製造方法に関する。

【0040】

前記組成物の製造は、通常用いられるいずれの方法でも製造でき、神経幹細胞抽出物を

10

20

30

40

50

分離する過程は、本発明の方法に限定されず当業界で通常実行される方法で実施可能である。例えば、培養中の神経幹細胞をトリプシン (Trypsin-EDTA) で処理して継代培養して、神経幹細胞培養液を収得して遠心分離して上澄み液をろ過し、この時、沈殿物細胞をホモジナイザーで均質化した後、遠心分離して上澄み液を収得して神経幹細胞抽出物を製造することができる。前記神経幹細胞抽出物である上澄み液には細胞内に含まれた構成成分が含まれている。神経幹細胞抽出物分離工程で既存の抽出物製造技術を利用して、当業者が容易に神経幹細胞抽出物の濃度を調節できるのは自明である。

【0041】

これに限定されるのではないが、好ましくは、前記工程 (a) の神経幹細胞は、脳の脳室領域 (ventricular zone) から抽出された神経幹細胞を不滅化させて得た細胞である。これに限定されるのではないが、前記工程 (a) で神経幹細胞は、0.01 ~ 15% (v/v) の FBS を含む培地で培養する。本発明の具体的な実施例では、胎児脳の脳室領域 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を利用して、これを不滅化 (immortal) させて細胞を得た。前記不滅化は、細胞培養条件下で動物細胞が半永久的な増殖活性を取得して死滅することなく増殖し続けるようになる状態をいって、本発明の属する技術分野で公示された技術を利用して不滅化させることができる。前記不滅化された細胞を DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS (fetal bovine serum)、及び 1% penicillin streptomycin が含まれた非誘導性培地に培養して非接着性細胞は除去した。前記過程で培養された神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を継代培養する過程で培養液を収得して、これを遠心分離して上澄み液をろ過して、神経幹細胞抽出物は、トリプシン (Trypsin-EDTA) 過程で得た細胞を均質化 (homogenization) を介して収得した。

上述した通り、本発明に係る外胚葉由来神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物は、発毛を促進したり脱毛を予防乃至治療できる医薬 (外) 品開発の原料として有用に使用できる。

【実施例】

【0042】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業者において通常の知識を有する者にとって自明である。

【0043】

実施例 1: 神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物生産

胎児脳の脳室領域 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を不滅化 (immortal) させて細胞を得た。具体的には、14 週の胎児神経細胞組織 (neural cell tissue) を 0.1% collagenase と 0.1% hyaluronidase 溶液を 37 で 1 時間処理して 0.05% Trypsin-EDTA 2-3 分処理して、single cells で分離した後、markers (CD45 - / CD133 + / CD34 -) を利用して FACS で分離した。これを N-2 supplement s、0.2 mg/ml hlearin、20 ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factors)、20 ng/ml EGF (Ei elrmal Growth Factor)、そして 10 ng/ml LIF が添加されたヒト神経球培養培地 (human neurosphere culture media) に培養した。

【0044】

10 ~ 14 日経過後、形成された neurospheres に collagenase を処理して single cells で分離してレトロウイルス媒介体 (retroviral vector) を利用して v-myc 遺伝子を形質導入 (transfecti

on)して選別(selection)過程で得た細胞をDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS(fetal bovine serum)、及び1% penicillin/streptomycinが含まれた非誘導性培地に培養した(Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express forebrain genes., Flax JD et al., Nature Biotechnology, vol. 16, 1998; Neuroprotective effect of neural stem cell-conditioned media in vivo in a mouse model of Huntington's disease., Lim H-C et al., Neuroscience Letters 435, pp 175 - 180, 2008)。

10

【0045】

150mm培養皿(culture dishes)に前記細胞を 5×10^5 を分株して、培養培地(culture medium)15ml添加後、37℃、5% CO₂ Incubatorで80% confluence時に培養液を収得した。この時、培養培地は、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS(fetal bovine serum)、1% penicillin/streptomycinが含まれた非誘導性培地であり、培養後非接着性細胞は除去した。前記過程で培養された神経幹細胞(neural stem cells、NSCs)を継代培養する過程で培養液を収得して、これを遠心分離して上澄み液をろ過して、神経幹細胞抽出物は、PBSで二回洗浄した後、トリプシン(Trypsin-EDTA)過程で得た細胞を3次蒸留水100mlを入れて、ホモジナイザー(homogenizer)で6000RPMで5分間均質化(homogenization)して、これを遠心分離(1500rpm、5分)して上澄み液を収得した。

20

【0046】

実施例2:神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物の全体タンパク質量

96-ウェルプレート(96-well plate)にタンパク質量が10~100 µgになるべく試料を入れて、全体積を100 µlに合わせた。この時Blankとしては、100 µlの蒸留水だけ入れた。以後、染色剤であるクマシーブルー(Coomassie blue)を入れてマイクロプレーリーダー(microplate reader)を利用して595nmで測定した。

30

その結果、図1に示された通り、神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物の全体タンパク質含有量が高く測定された。

【0047】

実施例3:神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物の細胞毒性及び細胞増殖測定

96-ウェルプレート(96-well plate)にウェル(well)当たり 1×10^3 個の細胞を接種して、その翌日神経幹細胞培養液と神経幹細胞抽出物を各々0%~100%(培養液だけ該当する)ずつ100 µlに合わせて処理した。24時間単位で、assay(WST-1)物質をウェル(well)当たり10 µlずつ添加して、インキュベーターで反応させた。以後、マイクロプレーリーダー(microplate reader)を利用して440nmで測定した。

40

その結果、図2A及び図3に示された通り、神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物の細胞毒性及び細胞増殖が測定された。

【0048】

実施例4:定量的RT-PCR(Quantitative RT-PCR)を介した毛髪成長因子及びサイトカインの発現量確認

この実験のために毛乳頭細胞を24-ウェルプレート(24-well plate)にウェル(well)当たり 1.5×10^4 個の細胞を接種して、その翌日神経幹細胞培養液と神経幹細胞抽出物を各々0%~100%(培養液だけ該当する)ずつ処理した。7

50

2時間処理後、リン酸化緩衝溶液(PBS)で洗浄して、トリゾル試薬(Trizol reagent)を利用して全体RNA(total RNA)を得た後、逆転写酵素(reverse transcriptase)を利用してcDNAを合成してquantitative RT-PCRを行った。

その結果、図3A～図6Bに示された通り、神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物処理群で毛髪成長に關与するVEGF、IGF、HGF、KGF成長因子または毛髪の成長期を誘導するShhの発現量が高く現れ、また、退化期を誘導するTGF- β 1は少なく発現することが示された。

【0049】

実施例5:神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を塗布したC57BL/6J皮膚組織での毛髪成長促進効果確認

10

5週齢C57BL/6Jマウス(mice)を 24 ± 2 で7日間順応過程を経た後、背中(back)の毛を除去して、1日1回本発明による神経幹細胞培養液(100%、v/v)と神経幹細胞抽出物(20%、v/v)を1ml処理した。対照群としては、complete culture media(DMEM+10% FBS)を用いて、処理後一定期間毎に毛髪を確認して、最大16日後マウスの毛髪成長促進効果を確認した。

その結果、図7A及び図7Bに示された通り、神経幹細胞抽出物(20%、v/v)及び神経幹細胞培養液が対照群に比べて毛髪成長促進効果があることが示された。

【0050】

20

実施例6:神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物を塗布したC57BL/6J皮膚組織での毛髪成長促進効果分析

1. 毛の長さ及び重量分析

5週齢C57BL/6Jマウス(mice)を 24 ± 2 で7日間順応過程を経た後、背中(back)の毛を除去して、1日1回本発明による神経幹細胞培養液(100%、v/v)と神経幹細胞抽出物(20%、v/v)を1ml処理した。対照群としては、complete culture media(DMEM+10% FBS)を用いて、処理後一定期間毎に毛髪を確認して、最大16日後マウスを犠牲(sacrifice)させて、毛髪成長促進効果のために毛の長さと重量を確認した。

その結果、図8A～図8Cに示された通り、発毛時期及び長さ、重量面で神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物(20%、v/v)処理群で毛髪成長促進効果があつて、特に神経幹細胞抽出物処理群で効果が大きいことを確認した。

30

【0051】

2. 組織H&E染色

5週齢C57BL/6Jマウス(mice)を 24 ± 2 で7日間順応過程を経た後、背中(back)の毛を除去して、1日1回本発明による神経幹細胞培養液(100%)と神経幹細胞抽出物(20%)を1ml処理した。対照群としては、complete culture media(DMEM+10% FBS)を用いて、処理後一定期間毎に毛髪を確認して、最大16日後マウスを犠牲(sacrifice)させて、毛髪成長促進効果のために毛穴の数を確認した。

40

その結果、図9A～図9Bに示された通り、発毛時期及び毛穴の数で神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物(20%、v/v)処理群で毛髪成長促進効果があつて、特に神経幹細胞抽出物処理群で効果が大きいことを確認した。

【0052】

3. 細胞成長マーカー分析

5週齢C57BL/6Jマウス(mice)を 24 ± 2 で7日間順応過程を経た後、背中(back)の毛を除去して、1日1回本発明による神経幹細胞培養液(100%、v/v)と神経幹細胞抽出物(20%、v/v)を1ml処理した。対照群としては、complete culture media(DMEM+10% FBS)を用いて、処理後一定期間毎に毛髪を確認して、最大16日後マウスを犠牲(sacrifice)

50

させて、その皮膚組織を4%ホルムアルデヒドに固定して、組織のパラフィン製法後、3um厚さで切断した組織をスライドに付けてパラフィン除去及び再水和過程 (deparaffinize and rehydrate) を実施した。その後、抗体回収 (antigen retrieval; citrate buffer、pH6.0) と、0.1%トリトン (Triton) X-100 を処理して正常口バ血清 (normal donkey serum) をブロッキング (blocking) を経て1次抗体を1:250で24時間処理した。以後、2次抗体を利用して1時間処理してDAPI染色を5分間進めた。ベクタシールドマウンティング (vectashield mounting medium) 剤を利用してスライドに固定させた後、共焦点顕微鏡 (Confocal Microscope) で結果を確認した。

10

その結果、図10A及び図10Bに示された通り、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物 (20%、v/v) で細胞成長を示すマーカーであるKi-67が増加することを確認した。

【0053】

4. 組織内遺伝子発現分析

5週齢C57BL/6Jマウス (mice) を 24 ± 2 で7日間順応過程を経た後、背中 (back) の毛を除去して、1日1回本発明による神経幹細胞培養液 (100%、v/v) と神経幹細胞抽出物 (20%、v/v) を1ml処理した。対照群としては、complete culture media (DMEM+10% FBS) を用いて、処理後一定期間毎に毛髪を確認して、最大16日後マウスを犠牲 (sacrifice) させて、その皮膚組織をトリゾル試薬 (Trizol reagent) を利用して全体RNA (total RNA) を得た後に、逆転写酵素 (reverse transcriptase) を利用してcDNAを合成してquantitative RT-PCRを行った。

20

その結果、図11及び図14に示された通り、神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物 (20%) で毛乳頭細胞マーカーであるalkaline phosphatase増加及び毛穴内増加したTmeff1及びTGFB β -2を介して幹細胞の分化を抑制するBMPs発現が減少させて、幹細胞 (CD34+) が活性化したことを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0054】

30

本発明に係る外胚葉由来神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物は、様々の成長因子及びサイトカインを含んで発毛促進効果が優れることが確認された。特に、本発明による組成物は多様な毛髪成長に関連した成長因子及びShh (Sonic hedgehog) を調節することによって、より根本的に発毛促進効果を示す。

【0055】

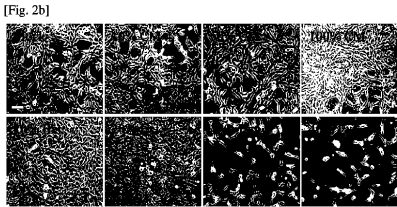
本発明による神経幹細胞培養液または神経幹細胞抽出物、または、ここで分離した特定因子等を発毛促進関連医薬外品等の原料として使用できて、本発明は発毛促進、脱毛防止及びハゲ治療関連分野で非常に有用である。

【0056】

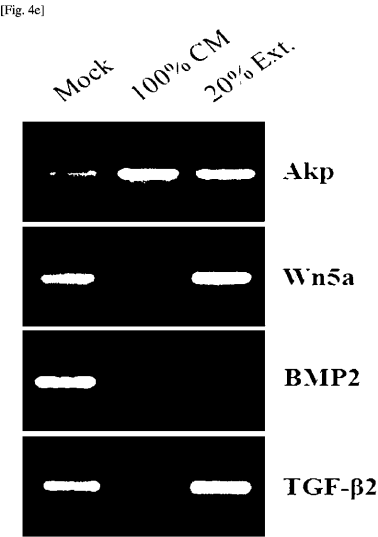
以上、本発明の内容の特定の部分を詳述したが、当業界における通常の知識を持った者にとって、このような具体的な記述は単なる好適な実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることはないという点は明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は特許請求の範囲とこれらの等価物により定義されると言える。

40

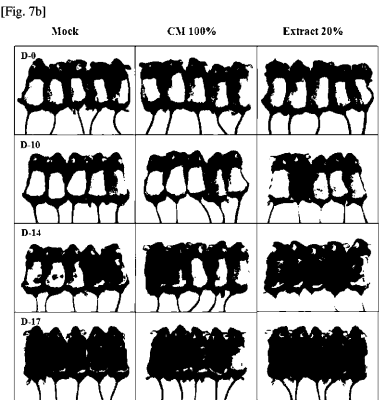
【 2 B 】



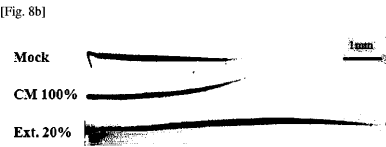
【 4 E 】



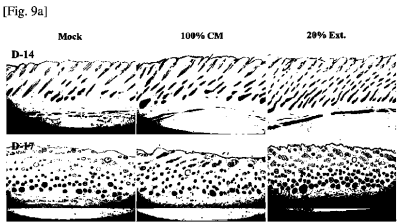
【 7 B 】



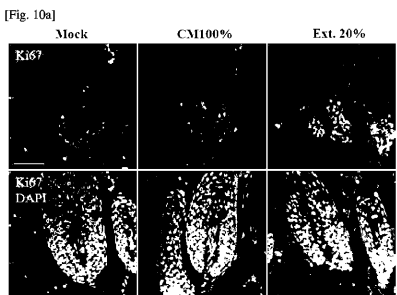
【 8 B 】



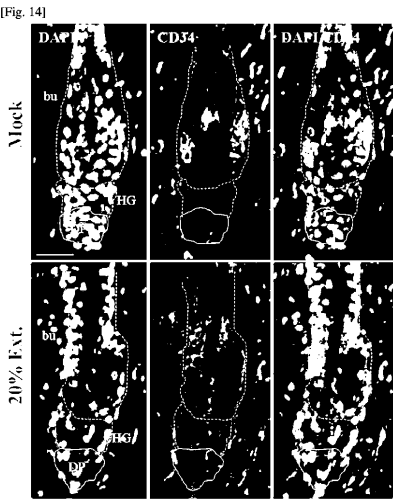
【 9 A 】



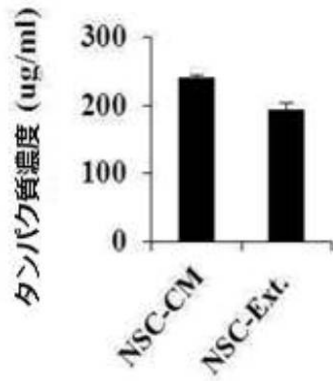
【 1 0 A 】



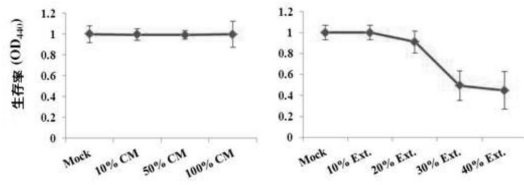
【 1 4 】



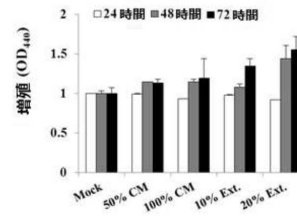
【図 1】



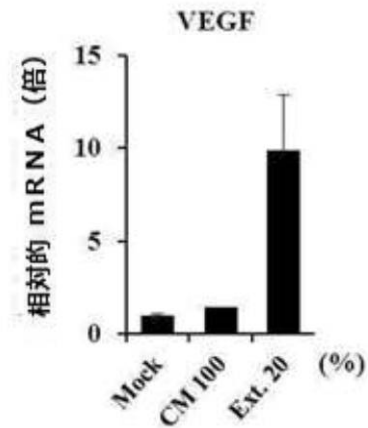
【図 2 A】



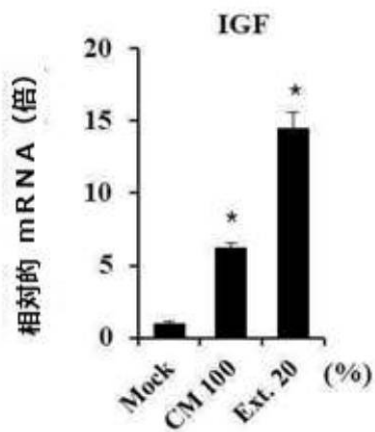
【図 3】



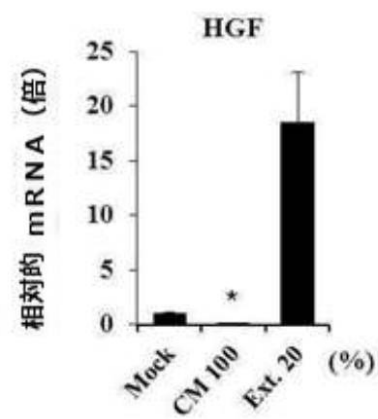
【図 4 A】



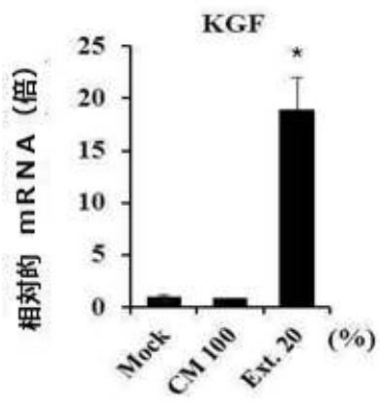
【図 4 B】



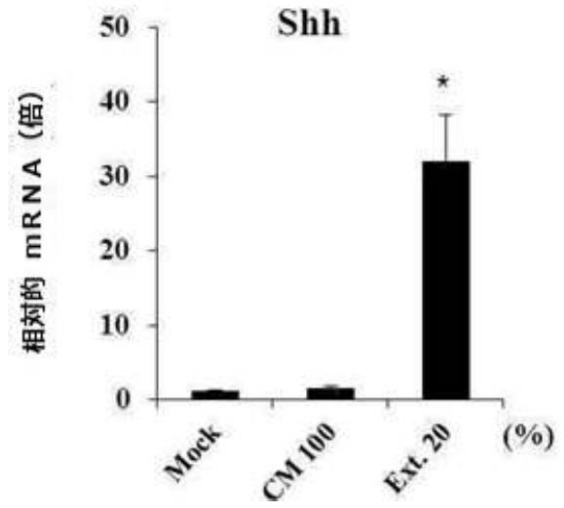
【図 4 C】



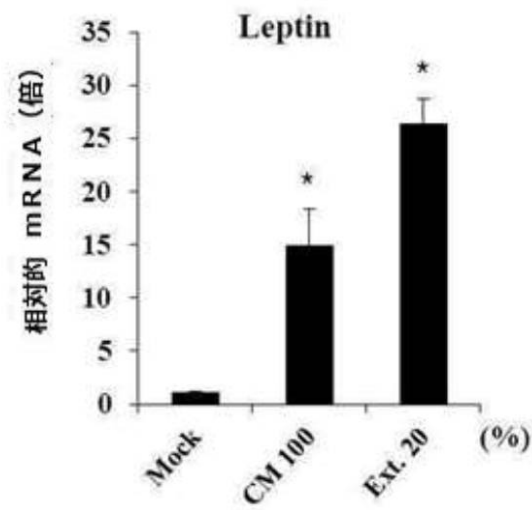
【图 4 D】



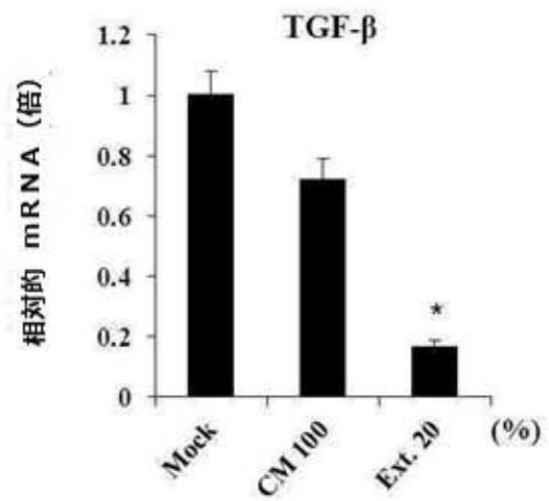
【图 5 A】



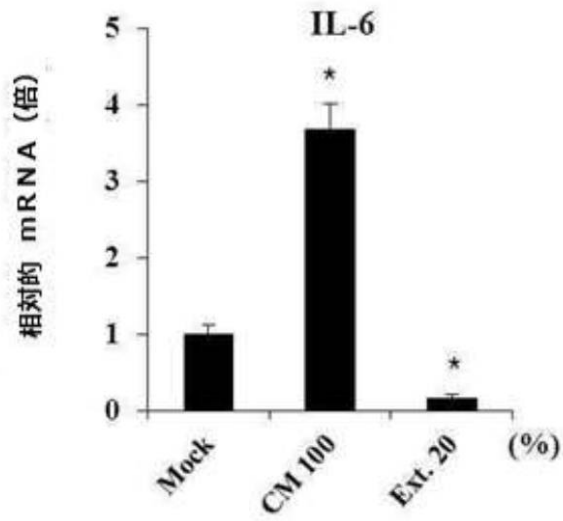
【图 5 B】



【图 6 A】



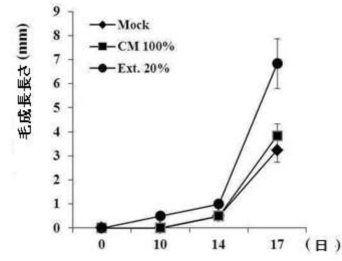
【図 6 B】



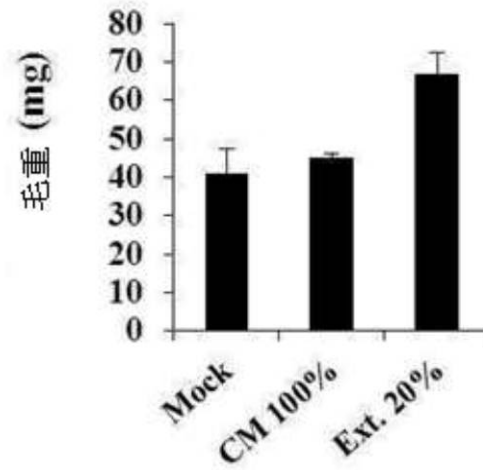
【図 7 A】



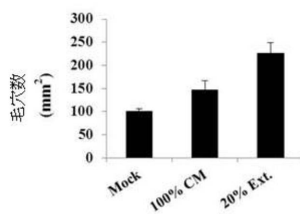
【図 8 A】



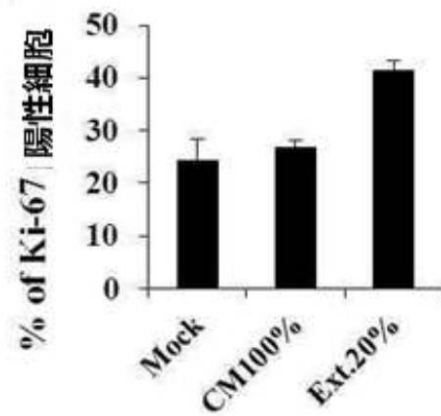
【図 8 C】



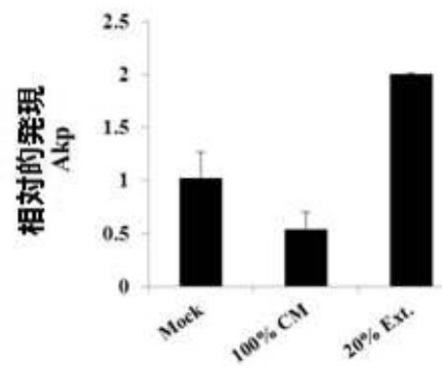
【図 9 B】



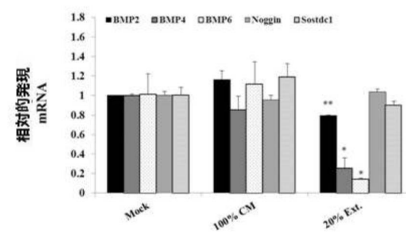
【図 10 B】



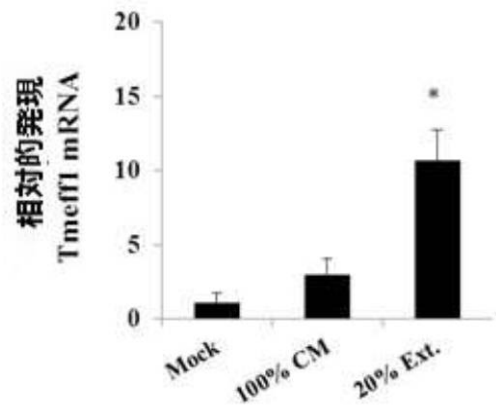
【図 11】



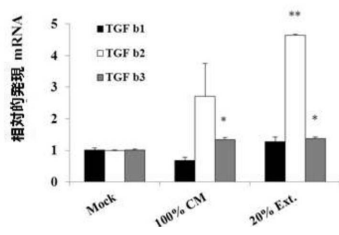
【図 12】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)		C 1 2 P 21/00	A
C 1 2 P 1/00 (2006.01)		C 1 2 P 21/00	H
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 1 2 P 21/00	K
C 0 7 K 14/475 (2006.01)		C 1 2 P 1/00	Z
C 0 7 K 14/52 (2006.01)		C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 5/074 (2010.01)		C 0 7 K 14/475	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)		C 0 7 K 14/52	
C 1 2 N 5/0797 (2010.01)		C 1 2 N 5/074	
		C 1 2 N 5/071	
		C 1 2 N 5/0797	

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ホン, スンホイ

大韓民国 1 0 0 - 7 3 4 ソウル, ジュン - グ, ワンシムニ - ロ 3 9 - キル, 3 0 ,
ハンジン グランビル アpartment, 1 0 2 - 5 0 8

(72)発明者 ファン, イン - シク

大韓民国 1 3 3 - 0 2 0 ソウル, ソンドン - グ, ワンシムニ - ロ 3 3 - キル, 1 2 -
1

(72)発明者 チョイ, キュン - エー

大韓民国 2 6 9 - 8 1 7 ガンウォン - ド, チョルウォン - グン, ドンソン - ウブ, グム
ハク - ロ 6 2 ボン - キル, 2 9

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 1 0 6 6 2 (J P , A)

特表 2 0 0 2 - 5 4 4 2 3 5 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 2 / 1 2 1 6 9 5 (W O , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 6 4 0 5 7 (U S , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 P 1 7 / 1 4

A 6 1 Q 7 / 0 0

W P I

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J a p i o - G P G / F X