

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7034944号
(P7034944)

(45)発行日 令和4年3月14日(2022.3.14)

(24)登録日 令和4年3月4日(2022.3.4)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	8/34 (2006.01)	A 6 1 K	8/34
A 6 1 Q	7/00 (2006.01)	A 6 1 Q	7/00
A 6 1 K	31/045(2006.01)	A 6 1 K	31/045
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14

請求項の数 4 (全20頁)

(21)出願番号	特願2018-559992(P2018-559992)	(73)特許権者	504244025
(86)(22)出願日	平成29年5月19日(2017.5.19)		ギウリアニ ソシエタ ペル アチオニ
(65)公表番号	特表2019-519502(P2019-519502 A)		イタリア国、2 0 1 2 9 ミラノ、ヴィア パラギ、2
(43)公表日	令和1年7月11日(2019.7.11)	(74)代理人	100166338
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/062110		弁理士 関口 正夫
(87)国際公開番号	WO2017/198818	(74)代理人	100152054
(87)国際公開日	平成29年11月23日(2017.11.23)		弁理士 仲野 孝雅
審査請求日	令和2年5月12日(2020.5.12)	(72)発明者	パウス ラルフ
(31)優先権主張番号	102016000051626		ドイツ国 2 2 3 3 9 ハンブルク フン メルスビュッテラー キルヒェンヴェグ 8 2
(32)優先日	平成28年5月19日(2016.5.19)	(72)発明者	シェレット ジェレミー
(33)優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)		ドイツ国 4 8 1 4 9 ミュンスター リ ュスヒハウスヴェグ 1 7
		最終頁に続く	

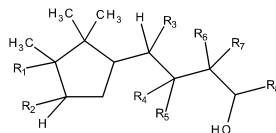
(54)【発明の名称】 ヒトにおける毛髪成長を促進し、かつ/または脱毛を阻害もしくは遅延させる化合物、ならびにかかる使用のための組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) :

【化 1】



式中：

R₁ および R₂ は、一緒に二重結合を形成し、または R₁ および R₂ は、一緒にシクロプロピル基を形成し；

R₃、R₄ は、同一であるかまたは異なり、独立して水素、メチルから選択され、または R₃ および R₄ は、一緒に二重結合を形成し；

R₅、R₆ は、同一であるかまたは異なり、独立して水素、メチルから選択され；または R₅ および R₆ は、一緒に二重結合を形成し；または R₅ および R₆ は、一緒にシクロプロピル基を形成し；

R₇ = メチルまたはエチルであり；

R₈ = 水素またはメチルである、

で表され、3 - メチル - 5 - (2 , 2 , 3 - トリメチルシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イル) ペンタン - 2 - オール、(4 Z) - 3 - メチル - 5 - (2 , 2 , 3 - トリメチルシク

ロペンタ - 3 - エン - 1 - イル) ペンタ - 4 - エン - 2 - オール、1 - メチル - 2 - ((1 , 2 , 2 - トリメチルピシクロ (3 , 1 , 0) ヘキサ - 3 - イル) メチル) - シクロプロパンメタノール、(E) - 3 , 3 - ジメチル - 5 - (2 , 2 , 3 - トリメチルシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イル) ペンタ - 4 - エン - 2 - オール、2 - メチル - 4 - (2 , 2 , 3 - トリメチル - 3 - シクロペンテン - 1 - イル) ブタノール、および (E) - 2 - メチル - 4 - (2 , 2 , 3 - トリメチル - 3 - シクロペンテン - 1 - イル) - 2 - ブテン - 1 - オールからなる群から選択される化合物の、

ヒト頭皮における育毛を促進し、かつ / または脱毛を抑制もしくは遅延させるための、化粧品の使用。

【請求項 2】

前記化合物が局所的投与用の組成物に配合される、請求項 1 に記載の使用。

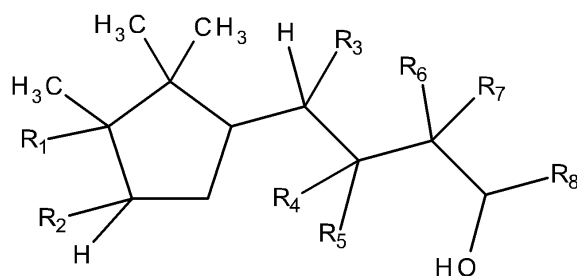
【請求項 3】

前記局所的投与用の組成物は、活性成分として、少なくとも前記化合物を 0 . 1 ~ 1 0 重量 % (w / w %) の量において含み、局所的投与に適した成分と共に処方されていることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

一般式 (I) :

【化 2】



式中：

R₁ および R₂ は、一緒に二重結合を形成し、または R₁ および R₂ は、一緒にシクロプロピル基を形成し；

R₃、R₄ は、同一であるかまたは異なり、独立して水素、メチルから選択され、または R₃ および R₄ は、一緒に二重結合を形成し；

R₅、R₆ は、同一であるかまたは異なり、独立して水素、メチルから選択され；または R₅ および R₆ は、一緒に二重結合を形成し；または R₅ および R₆ は、一緒にシクロプロピル基を形成し；

R₇ = メチルまたはエチルであり；

R₈ = 水素またはメチルである、

で表され、3 - メチル - 5 - (2 , 2 , 3 - トリメチルシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イル) ペンタン - 2 - オール、(4 Z) - 3 - メチル - 5 - (2 , 2 , 3 - トリメチルシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イル) ペンタ - 4 - エン - 2 - オール、1 - メチル - 2 - ((1 , 2 , 2 - トリメチルピシクロ (3 , 1 , 0) ヘキサ - 3 - イル) メチル) - シクロプロパンメタノール、(E) - 3 , 3 - ジメチル - 5 - (2 , 2 , 3 - トリメチルシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イル) ペンタ - 4 - エン - 2 - オール、2 - メチル - 4 - (2 , 2 , 3 - トリメチル - 3 - シクロペンテン - 1 - イル) ブタノール、および (E) - 2 - メチル - 4 - (2 , 2 , 3 - トリメチル - 3 - シクロペンテン - 1 - イル) - 2 - ブテン - 1 - オールからなる群から選択される化合物を含有する、ヒト頭皮における脱毛を処置するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトにおける毛髪成長を促進し、かつ / または脱毛を阻害もしくは遅延させる

ための化合物の使用、ならびに活性成分としてのかかる化合物を含むかかる使用のための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

白檀材の用語は、サンタラム属の樹木からの木材のクラスを指す。白檀材のエッセンシャルオイルは、通常成熟した白檀材の樹木からの木材の水蒸気蒸留によって抽出され、香料としての周知の貴重な成分である。

【0003】

その貴重な香りに主に関連する化粧品分野における多くの種々の用途の中で、白檀材油はまた、多くの種々の用途のための薬用の、および経験的な製造に関する特許公報の主題であり、脱毛およびフケの一般的処置を含み、例えば実際に漢方薬として定義される医薬抽出物を記載する特許公報特許文献1であり、マグノリアの花芽、ローズフラワー、リコリスルート、ピーニークパウダー、ケンフェリア、ライラック、ハーバアサリ、ジンセンおよびアンジェリカダウリカの根と混合された白檀材を含む。

10

【0004】

特許文献2および特許文献3には、同様の漢方薬が記載されており、前者は、白檀材、アンジェリカルート、根茎ケンフェリエ種子、タルク、カミメボウキ、天然インジゴおよびスパイクナルドの混合物製であり、後者は、白檀材、フリースフラワー根、松葉およびタンジンの混合物製であり、毛髪に適用するべきものである。

【0005】

20

実質的に同様の一般的用途のために、特許文献4には、ヤシ油、ユーカリ油、丁子油、ラベンダー油およびローズマリー油と混合したビャクダン油を含む、毛髪落ちを防止するための組成物が記載されている。

【0006】

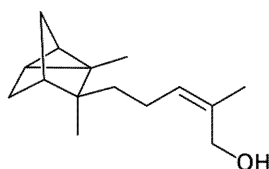
かかる経験的調製物について、最終的な油に混合される各成分の特定の役割は、かかる刊行物において定義されておらず、したがって混合物中の成分ビャクダン油のいずれの特定の機能も、香料としても、またはおそらくそれ以外としても、決定されていない。

【0007】

いずれの場合においても、白檀材油の主成分は、 α -サンタロール(santalol)および β -サンタロールであり、それは、基本的にセスキテルペンタイプの鎖を示すアルコールである。 α -サンタロールの構造式は、以下の通りであり：

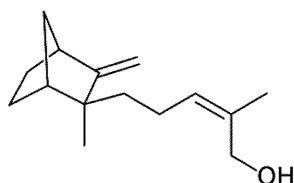
30

【化1】



一方、 β -サンタロールは、以下であり：

【化2】



40

それぞれ末端のトリシクロヘプタ-3-イルまたはビシクロヘプタ-2-イル基によって特徴づけられる。

【0008】

他方、サンダロア(sandalore)として知られている化合物は、白檀材に類似した芳香を有する合成の匂い物質であり、結果として香料、皮膚軟化剤および皮膚洗浄剤に

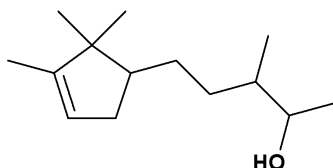
50

において、サンダロウツの香りを模倣する、より高価でない成分として使用される。サンダロア、およびブラマノール (brahmanol) と称される構造的に類似した化合物は、天然のビャクダン油の前記成分、すなわち - サンタロールおよび - サンタロールとは全く別個の化学構造を有するアルコールである。

【0009】

実際、次式：

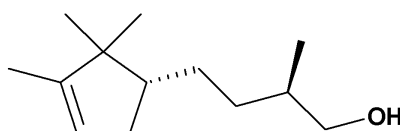
【化3】



10

を有するサンダロア、すなわちサンダルペンタノール (sandal pentanol) および次式：

【化4】



を有するブラマノール、すなわちサンダルシクロペンタン (sandal cyclopentane) は、共に末端のシクロペンテン - 1 - イル基によって特徴づけられる合成分子であり、セスキテルペン鎖を有さない。それらはまた、化粧品配合物、例えばシャンプーおよびヘアコンディショナー中の毛髪の処置に関する特許公報の主題であるが、しかしながら、実際には貴重な白檀材の香りを模倣するそれらの特性を使用する特定の目的のために芳香剤として使用されるに過ぎない。例えば、特許文献5には、脱臭効果を改善するための脱臭剤組成物が記載されており、ここで、幅広い数の物質および幅広い数の用途の中で、サンダロアおよびブラマノールの使用はまた、ヘアケア製品、例えばシャンプー、コンディショナー、ヘアリンス、毛髪着色剤、パーマメントウェーブ剤、ワックス、ヘアスプレーおよびムース中の脱臭芳香剤として記載されている。特許文献5において芳香剤として使用するべき天然起源の芳香剤物質は、ビャクダン油を含み、サンダロアおよびブラマノールは、上記物質の商品名として定義され、したがって、この文献によれば、天然抽出物によって提供される芳香剤とその合成代替物との間に区別はないことを意味する。

20

30

【0010】

特許文献6は、同様の範囲を有する毛髪の色のための脱臭剤組成物に関する。かかる文献には、脱毛の処置のための、または育毛を促進するためのかかる合成匂い物質の記載は、一般的にさえもない。

【0011】

非特許文献1によると、サンダロアおよびブラマノールは、皮膚性嗅覚受容体 OR2AT4 のアゴニストとして同定され、培養したヒトケラチノサイトにおいて Ca^{2+} シグナルを誘発すると見出された。サンダロアでのケラチノサイトの長期刺激によって、in vitro 創傷スクラッチアッセイにおいてケラチノサイト単層の細胞増殖、移動および再生に正の影響が及ぼされ、サンダロア刺激によって、ヒト皮膚器官培養における表皮創傷治癒が増強される。

40

【0012】

Busse et al. によると、天然のビャクダン油および他の合成の白檀材匂い物質は、嗅覚受容体 OR2AT4 のアゴニストではなく、同一の表皮創傷治癒効果を示さないという証拠が、記載されている。

【0013】

嗅覚受容体 (OR) 発現は、鼻腔上皮に限定されず、また異なるヒト組織中に存在する。非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4を参照。多くの研究には、様々なヒト細胞タ

50

イブ（非特許文献５）、例えば精子（非特許文献６；非特許文献７）、前立腺上皮細胞（非特許文献８）、腸の腸クロム親和性細胞（非特許文献９）におけるORの生理学的役割について記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１４】

【文献】CN 1 0 7 5 2 5 0 A

CN 1 0 2 0 0 0 2 9 3

CN 1 0 3 7 3 5 4 4 3

インド特許公報IN 0 0 1 7 7 MU 2 0 0 2 A

10

欧州特許第 1 5 6 1 4 7 6 号

欧州特許第 1 3 4 6 7 2 0 号

【非特許文献】

【００１５】

【文献】Busse et al., A Synthetic Sandalwood Odorant Induces Wound-Healing Processes in Human Keratinocytes via the Olfactory Receptor OR2AT4, Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134:2823-2832

Feldmesser E, Olender T, Khen M, Yanai I, Ophir R, Lancet D., Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. BMC Genomics. 2006年5月22日; 7:121

20

Zhang X, Firestein S., Nose thyself: individuality in the human olfactory genome. Genome Biol. 2007; 8(11):230

Flegel C, Manteniotis S, Osthold S, Hatt H, Gisselmann G., Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing. PLoS One. 2013; 8(2):55368

30

Kang N, Koo J. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. BMB Rep. 2012年11月; 45(11):612-22

Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science. 2003年3月28日; 299(5615):2054-8

Veitinger T, Riffell JR et al, Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioural phenotypes in human sperm. J Biol Chem. 2011年5月13日; 286(19):17311-25

40

Neuhaus EM, Zhang W, Gelis L, Deng Y, Noldus J, Hatt H. Activation of an Olfactory Receptor Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells. J Biol Chem. 2009; 284(24):16218-16225

Braun T, Volland P, Kunz L, Prinz C, Gratzl M. Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. Gastroente

50

rology . 2007年5月 ; 132 (5) : 1890 - 901

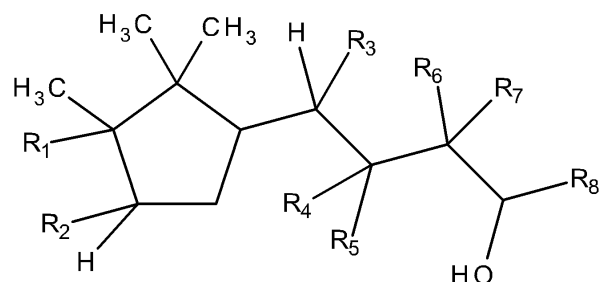
【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明によれば、驚くべきことに、ヒト頭皮において、一般式 (I) :

【化5】



10

式中：

R₁ および R₂ は、一緒に二重結合を形成し、または R₁ および R₂ は、一緒にシクロプロピル基を形成し；

R₃、R₄ は、同一であるかまたは異なり、独立して水素、メチルから選択され、または R₃ および R₄ は、一緒に二重結合を形成し；

R₅、R₆ は、同一であるかまたは異なり、独立して水素、メチルから選択され；または R₅ および R₆ は、一緒に二重結合を形成し；または R₅ および R₆ は、一緒にシクロプロピル基を形成し；

20

R₇ = メチルまたはエチルであり；

R₈ = 水素またはメチルである、

で表される化合物の使用により、育毛を促進することができ、脱毛を抑制または遅延させることができることが、見出された。

【0017】

本発明による新たな使用の範囲内で、前述のサンダルペンタノール (化合物 1) およびサンダルシクロペンタン (化合物 5) を含む式 (I) で表される好ましい化合物を、以下の表に報告する：

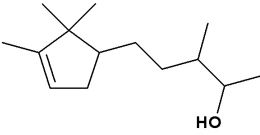
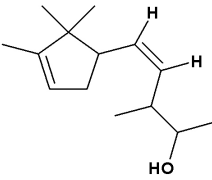
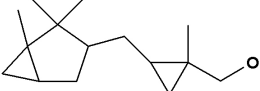
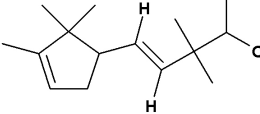
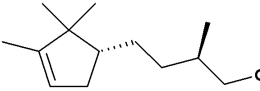
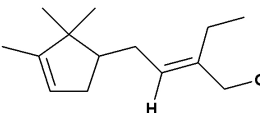
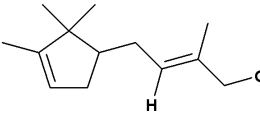
30

【0018】

40

50

【表 1】

	化合物	IUPAC名称	CAS N°	構造式	式／ MW
1	サンダルペ タノール	3-メチル-5-(2, 2, 3-トリ メチルシクロペンタ-3-エン-1 -イル)ペンタン-2-オール	65113-99-7		C ₁₄ H ₂₆ O 210.36
2	サンダルペ テノール	(4Z)-3-メチル-5-(2, 2, 3-トリメチルシクロペンタ-3- エン-1-イル)ペンタ-4-エン -2-オール	67801-20-1		C ₁₄ H ₂₄ O 208.35
3	サンダルシク ロプロパン	1-メチル-2-((1, 2, 2-トリ メチルビシクロ(3. 1. 0)ヘキサ -3-イル)メチル)-シクロプロ パン-メタノール	198404-98-7		C ₁₅ H ₂₆ O 222.37
4	サントールペ ンテノール	(E)-3, 3-ジメチル-5-(2, 2, 3-トリメチルシクロペンタ-3 -エン-1-イル)ペンタ-4-エ ン-2-オール	107898-54-4		C ₁₅ H ₂₆ O 222.37
5	サンダルシク ロペンタン	2-メチル-4-(2, 2, 3-トリ メチル-3-シクロペンテン-1 -イル)ブタノール	72089-08-8		C ₁₃ H ₂₄ O 196.34
6	サンダルロー ム	(E)-2-エチル-4-(2, 2, 3 -トリメチルシクロペンタ-3-エ ン-1-イル)ブタ-2-エン-1 -オール	28219-61-6		C ₁₄ H ₂₄ O 208.35
7	サンダルブテ ノール	(E)-2-メチル-4-(2, 2, 3 -トリメチル-3-シクロペンテン -1-イル)-2-ブテン-1- オール	28219-60-5		C ₁₃ H ₂₂ O 194.32

【0019】

本発明の目的はまた、ヒト頭皮に対する局所的投与に適した、育毛を促進し、かつ／または脱毛を抑制もしくは遅延させるにあたって使用するための組成物であって、1種以上の式(I)で表される化合物を、活性成分として、好ましくは0.1～10重量%(w/w%)の量において、局所的投与に適した成分と共に処方して用いる、前記組成物である。本発明の組成物は、ヒト頭皮において育毛を促進し、かつ／または脱毛を処置するにあたっての化粧品および治療的使用の両方に適しており、ここで一般式(I)で表される少なくとも1種の化合物は、活性成分として含まれる。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

本発明の特徴および利点を最良に理解するために、その非限定的な実例を、以下に記載する。成分は、INCI命名法に従って命名される。

【 実施例 】

【 0 0 2 1 】

実施例 1

ローション

【 表 2 】

成分(INCI名称)	量(w/w%)
変性アルコール	15-35
PEG-40水素化ヒマシ油	0.5-3
サンダルペンタノール	0.1-10.0
エトキシジグリコール	0.25-1.0
水	加えて100g

10

【 0 0 2 2 】

実施例 2

シャンプー前マスク

20

30

40

50

【表 3】

成分(INCI名称)	量(w/w%)	
グリセリン	1.5-4.5	
アクリロイルジメチルタウリン酸アンモニウム/vpコポリマー	1.0-2.0	
サンダルペンタノール	0.1-10.0	
シクロペンタシロキサン	1.0-2.0	
フェノキシエタノール	0.25-0.75	
パルファム	0.5-1.0	10
カプリリルグリコール	0.25-0.75	
フェニルトリメチコン	0.25-0.75	
シリコーンクオタニウム-17	0.1-0.4	
ジメチコン	0.1-0.4	
ラウレス-4	0.1-0.4	
セリシン	0.1-0.4	
酢酸トコフェリル	0.1-0.3	20
ラウレス-23	0.1-0.3	
ソルビン酸カリウム	0.05-0.15	
アンモニウムグリシリゼート	0.05-0.15	
クエン酸	0.04-0.08	
edta二ナトリウム	0.025-0.075	
メトキシシンナミン酸エチルヘキシル	0.025-0.075	
ジメチコノール	0.025-0.075	30
水 加えて100g		

【0023】

実施例 3

スタイリングジェルの強化

【表 4】

成分(INCI名称)	量(w/w%)
サンダルペンタノール	0.1-10.0
PEG-40水素化ヒマシ油	1-3
パルファム	0.5-1.5
ポリアクリレート-14	0.5-1.5
ヒドロキシプロピルグアー	0.5-1.5
水素化デンプン加水分解物	0.5-1.5
ヒドロキシメチルグリシン酸ナトリウム	0.25-1.0
ベンゾフェノン-4	0.15-0.45
edta二ナトリウム	0.05-0.15
ポリクオタニウム-11	0.0025-0.025
水 加えて100g	

10

【0024】

実施例 4

ヘアコンディショナーの強化

20

30

40

50

【表 5】

成分(INCI名称)	量(w/w%)	
セテアリルアルコール	15-25	
ステアリン酸グリセリル	15-25	
ジメチコン	10-20	
乳酸C12~13アルキル	5-15	
塩化セトリモニウム	2.5-7.5	
PEG-100ステアリン酸塩	2.5-7.5	10
シクロペンタシロキサン	2-6	
キシリトール	2-6	
サンダルペンタノール	0.1-10.0	
ヒドロキシエチルセルロース	1-3	
ジメチコノール	1-3	
ベンジルアルコール	0.1-1.0	
パンテノール	1-3	20
パルファム	1-2	
ビスーイソブチルPEG/PPG-20/35/アモジメチコンコポリマー	0.5-1.0	
フィタントリオール	0.5-1.0	
安息香酸ナトリウム	0.5-1.0	
デヒドロ酢酸ナトリウム	0.5-1.0	
セチルエチルヘキサノエート	0.5-1.0	
ブチレングリコール	0.5-1.0	
edta二ナトリウム	0.2-0.6	30
ポリソルベート80	0.2-0.6	
セリシン	0.2-0.6	
デヒドロ酢酸	0.1-0.3	
酵母多糖	0.1-0.3	
グルコノラクトン	0.05-0.15	
水 加えて100g		

40

【0025】

実施例 5

シャンプーの再生

【表 6】

成分(INCI名称)	量(w/w%)	
ラウレス硫酸マグネシウム	5-10	
ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	2-3	
サンダルペンタノール	0.1-10.0	
ラウレススルホコハク酸二ナトリウム	1.5-2.5	
PEG-200水素化パルミン酸グリセリル	1-2	
ココミドミパ	0.5-1.5	10
パルファム	0.5-1	
ジステアリン酸グリコール	0.5-1	
PEG-7グリセリルココエート	0.25-0.75	
ベタイン	0.25-0.75	
ラウリルメチルグルセス-10ヒドロキシプロピルジモニウムクロリド	0.25-0.75	
ラウレス-7	0.25-0.75	
ポリクオタニウム-10	0.25-0.75	20
ヒドロキシメチルグリシン酸ナトリウム	0.25-0.75	
カリウムウンデシレノイル加水分解小麦タンパク質	0.2-0.4	
パンテノール	0.1-0.3	
edta四ナトリウム	0.1-0.3	
フェニルトリメチコン	0.05-0.15	
シリコーンクオタニウム-17	0.05-0.12	
ラウレス-4	0.05-0.12	
ラウレス-23	0.025-0.075	30
ココアンホ酢酸ナトリウム	0.025-0.075	
BHA	0.005-0.015	
水 加えて100g		

【0026】

実施例 6

ムース

40

50

【表 7】

成分(INCI名称)	量(w/w%)
アルコール	10-20
サンダルペンタノール	0.1-10.0
PEG-40水素化ヒマシ油	1-2
グリセリン	1-1.5
オリバムホ酢酸ナトリウム	0.5-1.5
パルファム	0.5-1
トコフェロール	0.05-0.15
EDTA二ナトリウム	0.025-0.075
ポリクオタニウム-16	0.025-0.075
メタ重亜硫酸カリウム	0.01-0.03
水	加えて100g

10

【0027】

添付した図面の図1～5を参照して、

20

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、ヒト頭皮組織および毛包(HF)の試料から採取した免疫蛍光画像を示す。

【図2】図2は、毛幹伸長に関する図式を示す。

【図3】図3は、育毛サイクルに関する図式を示し、特に休止相を参照する。

【図4】図4は、毛髪マトリックスケラチノサイト増殖およびアポトーシスに関する図式を示す。

【図5】図5は、休止期促進成長因子TGF- α に関する図式を示す。

【0029】

30

図1～5は、以下の実験的研究において得られた結果に関し、したがって以下の記載において詳細に記載する。

【0030】

実験的研究

本発明による前記化合物1、すなわちサンダルペンタノールを、実験目的のために試験すべき式(I)で表される化合物の中から以下のように選択した。サンダルペンタノールを、図2～5の図式においてサンダロアと称する。

【0031】

試験設計

第1のステップとして、標準的な免疫蛍光技法を、OR2AT4がヒト頭髪毛包(HF)において発現するか否かを評価するために、健常ドナーからのヒト頭皮皮膚組織切片に対して用いた。

40

【0032】

次に、OR2AT4の刺激がヒト育毛に影響し得るか否かを評価するために、顕微解剖したHFを、アゴニストとして500 μ Mの濃度でのサンダルペンタノールで処理し、毛幹伸長測定を、実施した(Philpott et al., 1990を参照)。さらに、キナーゼアッセイを、いずれのシグナル伝達経路がサンダルペンタノールによるOR2AT4の特異的刺激に関与するかを同定するために実施した。

【0033】

その後、サンダルペンタノールの成長期延長効果が特異的であることを確認するために、

50

H F 器官培養を、サンダルペンタノールをアゴニストとして用い、合成香料である特異的アンタゴニストである P h e n i r a t (イソ酪酸フェノキシエチル) を用いて行った。B u s s e e t a l .、上で述べた参考文献を参照。

【 0 0 3 4 】

H F を、ビヒクル、サンダルペンタノール、P h e n i r a t またはサンダルペンタノールおよび P h e n i r a t の混合物のいずれかで処理した。毛周期の修飾を分析するために、K i 6 7 / T U N E L を実施し、それを使用して、毛周期スコアおよび毛髪マトリックスケラチノサイト増殖およびアポトーシスを評価した。

【 0 0 3 5 】

さらに、強力な休止期誘発物質である T G F β 2 を、同一の上記の化合物に関して調査した。

10

【 0 0 3 6 】

ヒト H F における O R 2 A T 4 の発現をダウンレギュレートし、育毛におけるこの作用を研究するために、H F を、O R 2 A T 4 - s i R N A でトランスフェクトした。

【 0 0 3 7 】

q R T - P C R および (免疫) 組織形態計測分析を用いて、顕微解剖した H F における O R 2 A T 4 遺伝子およびタンパク質の発現に s i R N A 媒介されたダウンレギュレーションを確認した。最後に、O R 2 A T 4 のノックダウンがヒト育毛にいかんして影響するかを調査するために、K i 6 7 / T U N E L 免疫蛍光法を用いて、毛周期スコアならびに毛髪マトリックスケラチノサイト増殖およびアポトーシスを定量した。

20

【 0 0 3 8 】

ノックダウンが休止期誘発に影響し得るか否かをチェックするために、T G F β 2 発現を、免疫蛍光法により分析した。

【 0 0 3 9 】

材料および方法

組織標本

側頭部の、および後頭部の正常なヒト頭皮を、インフォームド・コンセントおよび倫理的承認後、日常的な美容整形手術を受けている健康なドナー (年齢範囲 3 8 ~ 6 9 歳における) から得た。

【 0 0 4 0 】

30

免疫蛍光法

O C T 包埋試料を、クリオスタットで切片化した (厚さ 6 μ m)。切片を、4 % パラホルムアルデヒド中で固定し、1 0 % のヤギ血清 (O R 2 A T 4 について) または 5 % のヤギ血清 + 0 . 3 % の T r i t t o n X - 1 0 0 (切断したカスパーゼ 3 について) と共にブレインキュベートし、対応する一次抗体と共に 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした (O R 2 A T 4 について 1 / 1 0 0 および切断したカスパーゼ 3 について 1 / 4 0 0)。二次抗体インキュベーションを、R T で 4 5 分間行った。D A P I (1 μ g / m L) での対比染色を行って、核を可視化した。T G F β 2 について、試料をアセトン中で固定し、内因性ペルオキシダーゼを 3 % の H ₂ O ₂ で遮断した。このステップに、アビジン - ビオチン遮断ステップおよび T N B 緩衝液 (T r i s H C l + N a C l + カゼイン) とのブレインキュベーションを後続させた。対応する一次抗体を、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした (T G F β 2 について 1 / 1 0 0 0)。二次抗体インキュベーションを、R T で 4 5 分間行い、その後 T y r a m i d e シグナル増幅キット (P e r k i n E l m e r) を使用した。D A P I での対比染色を実施して、核を可視化した。アポトーシス細胞および増殖細胞を染色するために、本発明者らは、アポプタグキット (M e r c k M i l l i p o r e) を製造者のプロトコルに従って使用し、続いて K i 6 7 染色を行った。一次抗体を、T d T 酵素ステップの後に一晩インキュベートした (K i 6 7 、 1 / 2 0)。二次抗体を、アポプタグキットの蛍光標識した抗ジゴキシゲニンステップの後に R T で 4 5 分間インキュベートした。D A P I での対比染色を実施して、核を可視化した。陰性対照を、一次抗体を省略することによって供した。画像を、K e y e n c e 蛍光顕微鏡 (大阪、日本国) を用

40

50

い、さらなる分析のために画像化を通して一定の設定露出時間を維持して撮影した。

【0041】

H F 器官培養

ヒト頭皮試料を、美容整形手順の後に得、同日にヒトアナゲン V I 頭皮 H F を顕微解剖するために用いた。顕微解剖したヒト頭皮 H F を、37 °C で 5 % C O₂ で、2 m M の L - グルタミン (G i b c o)、10 n g / m l のヒドロコルチゾン (S i g m a - A l d r i c h)、10 μ g / m l のインスリン (S i g m a - A l d r i c h) および 1 % のペニシリン / ストレプトマイシン混合物 (G i b c o) (W E M) を補充した W i l l i a m ' s E 培地 (G i b c o , L i f e t e c h n o l o g i e s) の最小培地中で、以前記載されているように (P h i l p o t t , 1990 ; K l o e p p e r , 2010 ; L a n g a n e t a l , 2015) 培養した。

10

【0042】

1) ヒト顕微解剖 H F の O R 2 A T 4 サンドルペンタノール (アゴニスト) およびフェニラート (アンタゴニスト) での化学的刺激

24 時間のインキュベーションの後、W E M 培地を交換し、H F を、対応する物質で実験条件に従って 6 日間処理した。H F を、ビヒクル (0 . 1 % D M S O)、サンドルペンタノール (500 μ M)、フェニラート (アゴニストに対して 1 : 1 の比率において)、またはサンドルペンタノール + フェニラートの混合物のいずれかで処理した。

【0043】

P h e n i r a t を、サンドルペンタノールの 30 分前に添加した。毛幹伸長を、単対物双眼顕微鏡 (P h i l p o t t e t a l . , 1990) を用いて毎日測定し、培養培地を、2 日毎に交換した。次いで、H F を、次にクリオマトリックス (c r y o m a t r i x) (F i s h e r S c i e n t i f i c) 中に包埋し、液体窒素中でスナップ凍結した。厚さ 6 μ m の切片を、クリオスタットで切断し、さらなる免疫組織化学的分析のために - 80 °C で保存した。

20

【0044】

定量的 (免疫) 組織形態測定

染色強度を、良好に規定した参照領域において、以前記載されているように (B e r t o l l i n i e t a l . , 2014)、N I H I M A G E ソフトウェア (N I H , B e t h e s d a , M D , U S A) を用いた)、定量的 (免疫) 組織形態計測により評価した。

30

【0045】

統計的分析

すべてのデータを、平均 ± S E M として表し、2 つより多い群を比較した場合には O n e W a y A n o v a または K r u s k a l l W a l l i s 検定により、およびサンドルペンタノール処理をビヒクルに対して比較した場合にはスチューデント t - 検定または M a n n - W h i t n e y 検定により分析した (G r a p h P a d P r i s m 6 , G r a p h P a d S o f t w a r e , S a n D i e g o , C A , U S A)。

【0046】

結果

結果を、図 1 ~ 5 の添付した図面を参照して記載する。

40

1) ヒト H F は嗅覚受容体 2 A T 4 を発現する

最初に、H F 中の嗅覚受容体 2 A T 4 (O R 2 A T 4) の存在を、調査した。O R 2 A T 4 は、図 1 における免疫蛍光によって示すように、ヒト頭皮成長期 H F の球上 (s u p r a b u l b a r) 外毛根鞘 (O R S) ケラチノサイトにおいて観察された。

【0047】

図 1 からの写真 A) ~ D) は、3 人の異なるドナー (n = 3) からのヒト頭皮における H F (写真 A および対応する拡大を参照) ならびに顕微解剖した H F (写真 B ~ D および対応する拡大を参照) における O R 2 A T 4 免疫蛍光を表す。C T S は結合組織鞘を意味し、D P は毛乳頭を意味し、H M は毛母体を意味し、I R S は内毛根鞘を意味し、O R S は外毛根鞘を意味し、H S は毛幹を意味し、H B は毛球を意味し、H F は毛包を意味する。

50

点線は、IRS（内毛根鞘）、ORS（外毛根鞘）およびDP（毛乳頭）の輪郭を示す。

【0048】

図1は、OR2AT4が、成長期頭皮HFの球上ORSケラチノサイトにおいて、ならびに球上および延髄性ORSにおいて、ならびに顕微解剖した成長期HFにおける毛母体先端ケラチノサイトにおいて発現されることを示す。

【0049】

顕微解剖した成長期HF（Philpottモデル）によって、毛球における、すなわちORSおよび毛母体（HM）先端におけるOR2AT4細胞、図1Bを参照、が、特徴的な球上濾胞内発現、図1Dを参照、に加えて明らかになった。

【0050】

2) サンドルペンタノールによるOR2AT4の特異的刺激によって毛幹伸長が促進され、アポトーシスシグナル伝達経路が阻害される

OR2AT4の活性化がヒトHFの毛周期に影響し得るか否かをチェックするために、顕微解剖したヒトHFを、潜在的アゴニストであるサンドルペンタノールで特異的に刺激した。サンドルペンタノール処理の効果を、毛幹伸長をビヒクルと比較して測定することによって評価した。

【0051】

HF伸長を、培養した顕微解剖したHFにおいて測定した。平均±SEM、各ドナーについてn=18 HF、ドナー2人、スチューデントt検定、Graph Pad Prism 6。個体間の差異にもかかわらず、結果によって、図2の図式に示すように、濃度500μmのサンドルペンタノールが2人のドナーに由来する培養した顕微解剖したHFの毛幹伸長を刺激することが明らかになり、ビヒクルと比較したサンドルペンタノールの培養の日数に対する%伸長を報告する。

【0052】

3) サンドルペンタノールによるOR2AT4の活性化によって、ヒト毛母体ケラチノサイトにおける休止期誘発が有意に遅延し、アポトーシスが減少する

サンドルペンタノールによるOR2AT4刺激の毛髪成長に対する効果の特異性を調査するために、顕微解剖したHFをサンドルペンタノールおよび/またはフェニラートで培養し、毛周期を以前記載されているようにステージング分析した（Kloepper, 2010; Langan et al, 2015）。毛周期スコアを、6日間の培養の後、処理した、およびビヒクルのHFの両方において測定した。3人の患者からN=16~24のHF、平均±SEM、事後hoc検定としてのKruskal Wallis検定およびDunnの多重比較検定、ns、Mann-Whitney検定、#p<0.05、Graph Pad Prism 6。

【0053】

得られた結果は、図3の図式に示すように、500μmの濃度でのサンドルペンタノール単独によるOR2AT4の特異的刺激によって、処理したHFにおける休止期誘発が、6日の培養の後にビヒクルと比較して遅延したことを示す。対照的に、両方の比較基準、Phenirat単独およびPheniratと共に投与したサンドルペンタノールの混合物によって、ビヒクルと比較して、処理したHFにおける成長期は延長されなかった。データから、サンドルペンタノールによるOR2AT4の刺激によって休止期遅延が促進され、一方これらの効果はPheniratを用いた場合のOR2AT4阻害によって打ち消されることが示唆される。

【0054】

要約すると、図3は、本発明の化合物によって休止期発生が有意に遅延することを示す。

【0055】

4) サンドルペンタノールによって毛母体ケラチノサイトアポトーシスが有意に減少する

図4の証拠を参照して、サンドルペンタノールが毛母体ケラチノサイト増殖およびアポトーシスに影響するか否かを調査するために、Ki67/TUNEL染色を実施した。増殖（図4Aの図式）およびアポトーシス（図4Bの図式）毛母体ケラチノサイトを、処理し

10

20

30

40

50

た、およびビヒクルのHFの毛母体中で計数した。Ki67/TUNELの代表的な写真を、図4、C～Eに示す。平均±SEM、3人の患者からのn=18～21 HF、事後hoc検定としてのKruskal-Wallis検定およびDunnの複数比較検定、**p<0.01、***p<0.001、Mann-Whitney検定、#p<0.05、Graph Pad Prism 6。

【0056】

6日間の培養の後、毛母体ケラチノサイト増殖は、サンダルペンタノールまたはPhenirát単独で処理したHFにおいては変化しなかった。しかしながら、OR2AT4の特異的アンタゴニストであるPhenirátのサンダルペンタノールと一緒に同時投与によって、図4Aに示すように、毛母体ケラチノサイト増殖に関する有意な減少が誘発された。

10

【0057】

図4Bに示すように、サンダルペンタノール処理によって、毛母体ケラチノサイトアポトーシスが有意に減少し、一方サンダルペンタノール+Phenirátの同時投与によって、毛母体ケラチノサイトアポトーシスが有意に増加した。

【0058】

5) サンダルペンタノールによるOR2AT4の特異的刺激によって、休止期促進成長因子TGF- β 2が有意に減少した

図5の証拠を参照して、いかにしてORアゴニストおよびアンタゴニストがHF増殖に影響するかをさらに調査するために、近位ORにおける、生理学的ヒトHFサイクリングの間の関連する休止期促進成長因子、すなわちTGF- β 2の発現(Somai et al., 2002)を、試験した。サンダルペンタノールで6日間処理した後、タンパク質レベルでのTGF- β 2発現の有意な減少が観察され、一方受容体をPhenirátで遮断することによって変化は検出されなかった。この場合において、サンダルペンタノールのPhenirátとの同時投与によって、図5Aの図式に示すように、サンダルペンタノール単独の投与によって得られたのと同等の結果が示された。TGF- β 2発現を、処理した、およびビヒクルのHF中のORSケラチノサイトにおいて測定した。

20

【0059】

TGF- β 2免疫蛍光の対応する代表的な写真を、図5に示す。B(ビヒクル)、C(サンダロア)、D(サンダロア+Phenirát)。

30

【0060】

TGF- β 2発現を、Image Jを用いて定量化した。2人の患者からの平均±SEM、n=14～22 HF、事後hoc検定としてKruskal-WallisおよびDunnの多重比較検定、*p<0.05、***p<0.001、およびMann-Whitney検定、ns。Graph Pad Prism 6。

【0061】

結論

上記結果は、全体的に、OR2AT4が育毛モジュレーターであり、本発明の化合物が成長期延長剤であることを示す。本発明の化合物によるOR2AT4の刺激によって、毛幹伸長が増加し、休止期相転移が遅延し、一方当該効果は、OR2AT4阻害剤Phenirátでは得られず、本発明の化合物をPhenirátと同時に投与した場合に実質的に打ち消される。

40

【0062】

本発明の化合物によるOR2AT4の刺激によって、アポトーシスシグナル伝達経路が調節され、ヒト毛母体ケラチノサイトにおけるアポトーシスが有意に減少し、一方この効果はPhenirátでは得られず、本発明の化合物をPhenirátと同時に投与した場合に実質的に打ち消される。本発明の化合物によるOR2AT4の刺激によって、関連する休止期促進成長因子TGF- β 2が有意に減少し、一方この効果は、Phenirátでは得られない。

【0063】

50

一般的用語において、実験的証拠によって、上記で定義した式（Ⅰ）で表される化合物を、ヒト頭皮における育毛を促進するために、および/または脱毛を抑制もしくは遅延させるために有効に使用することができることが示される。

【図面】

【図 1】

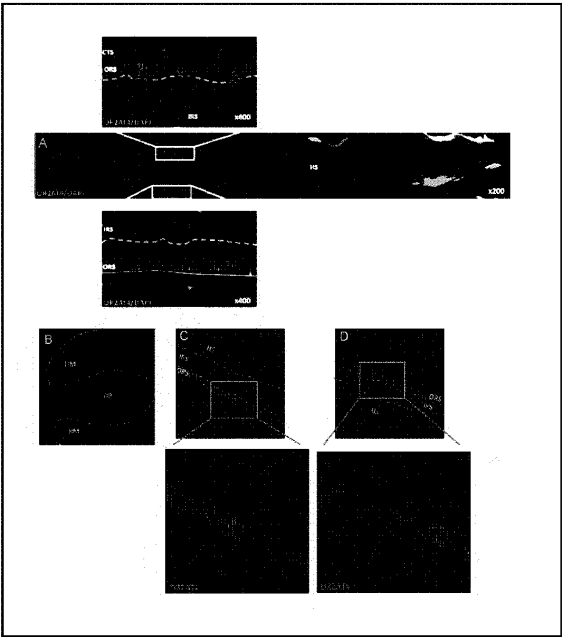
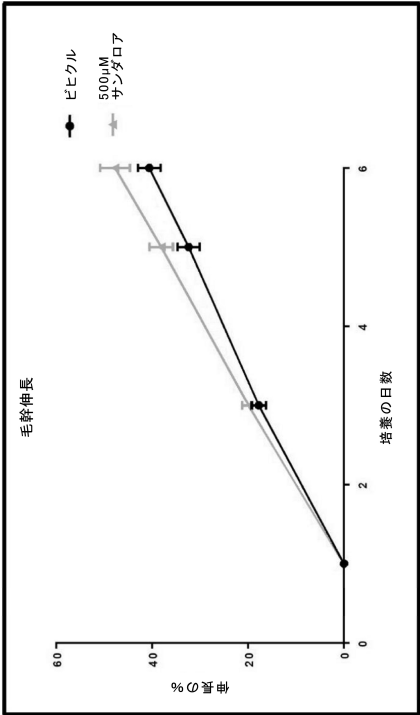
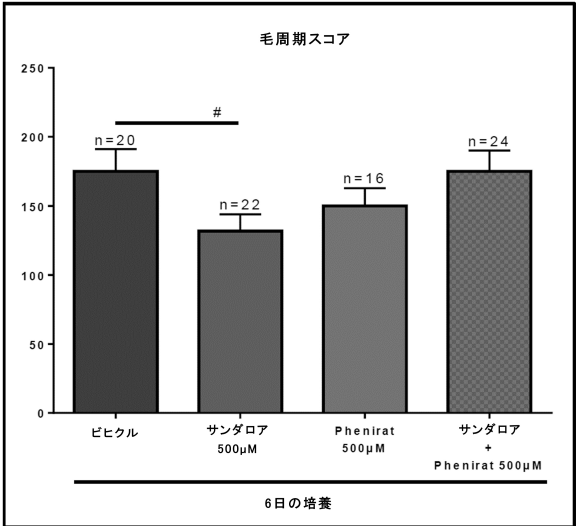


Fig. 1

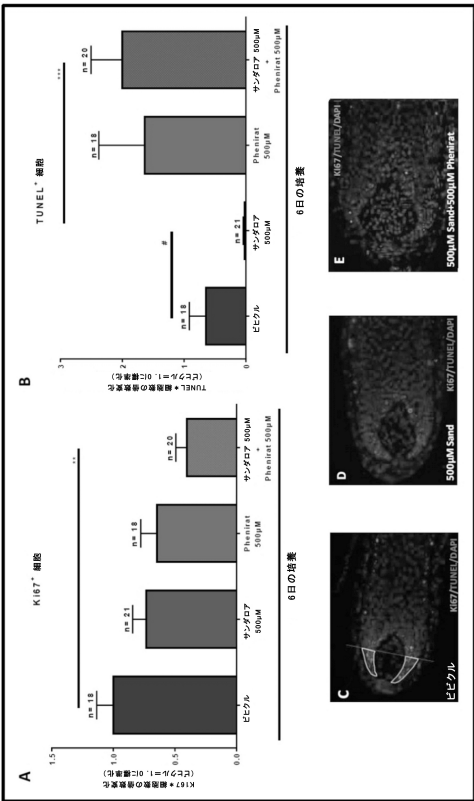
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

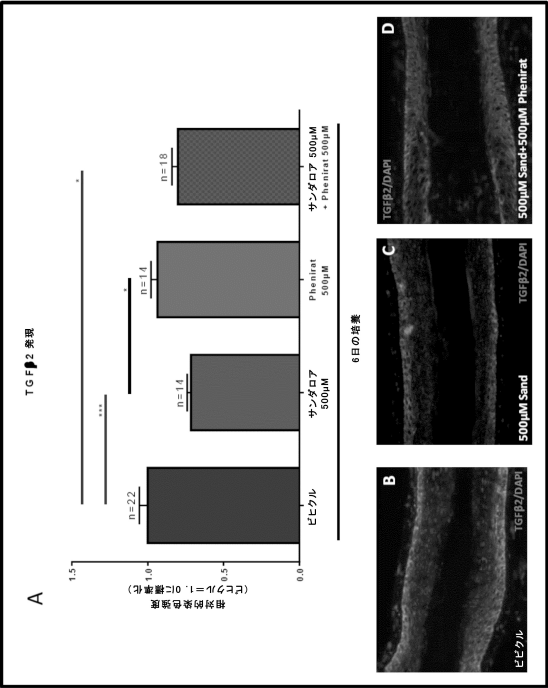
20

30

40

50

【図 5】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 ハット ハンス
 ドイツ国 44789 ボーフム シュトルツェシュトラッセ 39
(72)発明者 パローニ セルジオ
 イタリア国 24030 ヴィラ ダッダ ヴィア ピアッツオーロ 3

審査官 宮部 裕一

(56)参考文献 特開2006-160698(JP,A)
 特表2017-518324(JP,A)
 特開2003-277246(JP,A)
 特開2002-265978(JP,A)
 特開2000-336017(JP,A)
 特開2001-151644(JP,A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
 A61K 8/34
 A61Q 7/00
 A61K 31/045
 A61P 17/14
 CAplus/BIOSIS/KOSMET/MEDLINE(STN)