(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6721901号
(P6721901)
(45)発行日　令和2年7月15日(2020.7.15)　(24)登録日　令和2年6月23日(2020.6.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08	ZNA
A61K 38/03	(2006.01)	A61K	38/03	
A61K 38/02	(2006.01)	A61K	38/02	
A61P 37/04	(2006.01)	A61P	37/04	
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39	

請求項の数 15　(全 32 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-550402 (P2016-550402)
(86)(22)出願日　平成27年9月25日 (2015.9.25)
(86)国際出願番号　PCT/JP2015/077139
(87)国際公開番号　WO2016/047763
(87)国際公開日　平成28年3月31日 (2016.3.31)
審査請求日　平成30年9月25日 (2018.9.25)
(31)優先権主張番号　特願2014-197386 (P2014-197386)
(32)優先日　平成26年9月26日 (2014.9.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘１番１号
(74)代理人　100077012
弁理士　岩谷　龍
(72)発明者　中神　啓徳
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内
(72)発明者　森下　竜一
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内
(72)発明者　郡山　弘
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規ペプチドおよびその用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号９）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチドを含有する免疫賦活剤。
【請求項２】
ワクチン用アジュバントである、請求項１に記載の免疫賦活剤。
【請求項３】
前記ペプチドが、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）のアミノ酸配列を含むペプチドである請求項１または２に記載の免疫賦活剤。
【請求項４】
前記ペプチドが、Ｃ末端がアミド化されているペプチドである請求項１～３のいずれかに記載の免疫賦活剤。
【請求項５】
前記ペプチドが、Ｎ末端がアセチル化されているペプチドである請求項１～４のいずれかに記載の免疫賦活剤。
【請求項６】
ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号９）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチドおよび少なくとも一つの抗原を含有するワクチン組成物。
【請求項７】
前記抗原が、アンジオテンシンＩＩペプチドまたはＷＴ１ペプチドである請求項６に記

載のワクチン組成物。
【請求項８】
前記ペプチドが、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）のアミノ酸配列を含むペプチドである請求項６または７に記載のワクチン組成物。
【請求項９】
前記ペプチドと前記抗原が連結されている請求項６～８のいずれかに記載のワクチン組成物。
【請求項１０】
前記ペプチドが、Ｃ末端がアミド化されているペプチドである請求項６～９のいずれかに記載のワクチン組成物。
【請求項１１】
前記ペプチドが、Ｎ末端がアセチル化されているペプチドである請求項６～１０のいずれかに記載のワクチン組成物。
【請求項１２】
ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号９）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチドを含有する育毛剤。
【請求項１３】
前記ペプチドが、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）のアミノ酸配列を含むペプチドである請求項１２に記載の育毛剤。
【請求項１４】
前記ペプチドが、Ｃ末端がアミド化されているペプチドである請求項１２または１３に記載の育毛剤。
【請求項１５】
前記ペプチドが、Ｎ末端がアセチル化されているペプチドである請求項１２～１４のいずれかに記載の育毛剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規ペプチドおよび該ペプチドを含む免疫賦活剤、ワクチン用アジュバント、ワクチン組成物または育毛剤に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
アジュバントは、抗原と混合して生体に投与することにより、投与した抗原に対する免疫応答を増強する物質である。アジュバントには、Ｔｈ１タイプの反応を誘導するものやＴｈ２タイプの反応を誘導するもの、またはＴｈ１タイプとＴｈ２タイプの両方を誘導するものがある。ワクチン治療には一般にアジュバントが必要であり、抗原を宿主に認識させやすくする一方で、長く局所に留める性能が求められる。アジュバントは炎症を惹起する性格があるため、投与部位の痛み、腫脹等の副反応がしばしば問題となっており、これまで臨床応用されたワクチンの中にもしばしば投与部位の副反応が問題として取り上げられている。古くからアラム（水酸化アルミニウム）がアジュバントとして用いられているが、安全性は比較的高いもののワクチンの効率向上のためにはさらに有効なアジュバントが求められている。
【０００３】
加齢、遺伝的素因、社会的ストレス等の原因による脱毛症で悩んでいる人は多く、発毛を促進する育毛剤や、脱毛を防止する抗脱毛剤等、種々開発されている。
例えば、特定の配列を有する大豆タンパク由来のペプチドを有効成分として含む抗脱毛剤が知られている（特許文献１）。
【０００４】
本発明者らは、以前に血管新生作用と抗菌作用を併せ持つペプチドとして、３０アミノ酸残基からなるＡＧ３０（非特許文献１、特許文献２）を見出し、これに変更を加えて血

管新生作用および抗菌作用の改良を行ってきた（非特許文献２、特許文献３、特許文献４、特許文献５、特許文献６）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【特許文献１】特開２００８－２４７８７４号公報

【特許文献２】国際公開第２００５／０９０５６４号

【特許文献３】国際公開第２０１０／０６１９１５号

【特許文献４】国際公開第２０１０／１０１２３７号

【特許文献５】国際公開第２０１０／１３７５９４号

【特許文献６】特開２０１２－１４５８３号公報

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，２００８；１３：５３５－４６

【非特許文献２】Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．Ｖｏｌ１６，Ｎｏ７，２０１２，ｐｐ．１６２９－１６３９

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

本発明は、免疫賦活作用または育毛・発毛促進作用を有する新規短鎖ペプチドを提供し、当該ペプチドを含有する新規な免疫賦活剤、ワクチン用アジュバント、ワクチン組成物または育毛剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

上記課題を解決するために、ＡＧ３０をさらに変更することにより免疫賦活作用または育毛・発毛促進作用を有する２３個以下のアミノ酸残基からなるペプチドを見出し、本発明を完成させた。本発明は、以下の各発明を包含する。

〔１〕ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチド。

〔２〕ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号９）で示されるアミノ酸配列を含む前記〔１〕に記載のペプチド。

〔３〕ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記〔１〕または〔２〕に記載のペプチド。

〔４〕Ｃ末端がアミド化されている前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のペプチド。

〔５〕Ｎ末端がアセチル化されている前記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のペプチド。

〔６〕前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドを含有する免疫賦活剤。

〔７〕ワクチン用アジュバントである、前記〔６〕に記載の免疫賦活剤。

〔８〕前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドおよび少なくとも一つの抗原を含有するワクチン組成物。

〔９〕前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドを含有する育毛剤。

〔１０〕哺乳動物に対して、前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドの有効量を投与することを特徴とする免疫賦活方法。

〔１１〕哺乳動物に対して、前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドの有効量を投与することを特徴とするワクチン抗原の免疫原性増強方法。

〔１２〕免疫応答を賦活化させるために使用する前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチド。

〔１３〕ワクチン抗原の免疫原性を増強させるために使用する前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチド。

〔１４〕免疫賦活剤、ワクチン用アジュバントまたはワクチン組成物を製造するための前

記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドの使用。
〔１５〕哺乳動物に対して、前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドの有効量を投与することを特徴とする育毛または発毛促進方法。
〔１６〕育毛または発毛を促進するために使用する前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチド。
〔１７〕育毛剤を製造するための前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチドの使用。
【発明の効果】
【０００９】
本発明は新規ペプチドを提供する。本発明の新規ペプチドは、免疫賦活作用および育毛・発毛促進作用を有する。本発明の新規ペプチドは先行特許等に記載されている類似ペプチドと比較して顕著に強い免疫賦活作用を有する。さらに、当該ペプチドを含有する新規な免疫賦活剤、ワクチン用アジュバント、ワクチン組成物および育毛剤を提供することができる。
【００１０】
本発明のペプチドは、サイトカインの産生誘導作用、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導作用、インフラマソーム活性化作用を有し、免疫賦活剤として有用である。さらに、ワクチン抗原の免疫原性増強作用を有し、ワクチン用アジュバントとして特に有用である。本発明のペプチドを含むワクチン用アジュバントは、感染症、癌、生活習慣病等に対する各種ワクチン療法において、効率のよいアジュバントとして利用できる。さらに、本発明のアミノ酸残基数が２３以下の短鎖ペプチドは、高効率な合成法や検定法が確立されているため、安いコストで量産が可能という利点を有している。
【００１１】
本発明のペプチドは、毛乳頭細胞増殖作用および毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進作用を有し、育毛剤、発毛促進剤等として有用である。本発明者等は３０アミノ酸残基からなるＡＧ３０に変更を加えて複数のペプチド合成してきたところ、毛乳頭細胞増殖作用および毛乳頭細胞に対する増殖因子の産生促進作用においては、本発明のペプチドが顕著に強い活性を有していた。さらに、有効成分であるアミノ酸残基数が２３以下の短鎖ペプチドは、高効率な合成法や検定法が確立されているため、安いコストで量産が可能という利点を有している。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】ＬＰＳでプライミングしたＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１を添加したときの培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＩＬ－１８、（Ｃ）がＴＮＦα、（Ｄ）がＩＬ－６の結果である。
【図２】ＰＭＡで分化させたＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１を添加したときの培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＩＬ－１８、（Ｃ）がＴＮＦα、（Ｄ）がＩＬ－６の結果である。
【図３】ＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１、ＡＡＰ－１～ＡＡＰ－６を添加したときのＣＤ８６およびＣＤ５４の発現量を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＣＤ８６、（Ｂ）がＣＤ５４の結果である。
【図４】ＴＨＰ－１細胞にＡＡＰ－６、ＡＡＰ－１１およびＡＡＰ－１２を添加したときのＣＤ８６およびＣＤ５４の発現量を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＣＤ８６、（Ｂ）がＣＤ５４の結果である。
【図５】ＮＬＲＰ３の発現レベルをウェスタンブロットにより確認した結果を示す図である。
【図６】ＮＬＲＰ３に対するｓｉＲＮＡまたはコントロールｓｉＲＮＡをトランスフェクションしたＴＨＰ－１細胞を用いて、ＯＳＫ－１を１０μｇ／ｍＬの濃度で添加したときのＩＬ－１βおよびＴＮＦα産生量を比較した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＴＮＦαの結果である。

【図７】ＬＰＳによるＴＨＰ－１細胞のプライミングの有無による、ＯＳＫ－１のＩＬ－１β産生作用を比較した結果を示す図である。
【図８】カテプシンＢの阻害剤およびカスペース-１の阻害剤の有無による、ＯＳＫ－１のＩＬ－１β産生作用を比較した結果を示す図である。
【図９】イヌにおけるＯＳＫ－１のアジュバント効果をフロイントアジュバント（ＦＡ）の効果と比較した結果を示す図であり、（Ａ）がＯＳＫ－１群、（Ｂ）がＦＡ群の結果である。
【図１０】マウスにおけるＯＳＫ－１のアジュバント効果を、Ａｌｕｍ、フロイントアジュバント（ＦＡ）のアジュバント効果と比較した結果を示す図である。
【図１１】ヒト毛乳頭細胞にＯＳＫ－１、ＡＡＰ－１～ＡＡＰ－６を作用させ、培養上清中の成長因子濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＫＧＦ、（Ｂ）がＨＧＦ、（Ｃ）がＶＥＧＦの結果である。
【図１２】ＴＨＰ－１細胞に対するＯＳＫ－１と類似ペプチドのＣＤ５４発現誘導作用を比較した結果を示す図である。
【図１３】ＯＳＫ－１のＭＳ解析結果を示す図である。
【図１４】ＯＳＫ－１のＨＰＬＣ解析結果を示す図である。
【図１５】ＰＭＡで分化させたＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１を添加したときの培養上清中のサイトカイン、ケモカイン濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＩＬ－１８、（Ｃ）がＴＮＦα、（Ｄ）がＩＬ－６、（Ｅ）がＲＡＮＴＥＳ、（Ｆ）がＭＩＰ－１α、（Ｇ）がＭＩＰ－１βの結果である。
【図１６】ＬＰＳでプライミングしたＲＡＷ２６４．７細胞にＯＳＫ－１を添加したときの培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＩＬ－１８、（Ｃ）がＴＮＦα、（Ｄ）がＩＬ－６の結果である。
【図１７】マウス骨髄由来樹状細胞にＯＳＫ－１を添加したときの培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＩＦＮγ、（Ｃ）がＴＮＦα、（Ｄ）がＩＬ－６、（Ｅ）がＩＬ－１２ｐ７０の結果である。
【図１８】ＬＰＳでプライミングしたＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１、ＡｌｕｍまたはＣｐＧヌクレオチドを添加したときの培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＩＬ－１β、（Ｂ）がＩＬ－１８、（Ｃ）がＴＮＦα、（Ｄ）がＩＬ－６の結果である。
【図１９】ＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１またはＡｌｕｍを添加したときのＣＤ８６およびＣＤ５４の発現量を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＣＤ８６、（Ｂ）がＣＤ５４の結果である。
【図２０】ＴＨＰ－１細胞に対するＯＳＫ－１のＮＦκＢの活性化作用を確認した結果を示す図である。
【図２１】ＯＳＫ－１－アンジオテンシンＩＩコンジュゲートワクチンをマウスに投与して抗体産生作用を評価した結果を示す図である。
【図２２】ＯＳＫ－１－アンジオテンシンＩＩコンジュゲートワクチンをマウスに投与して産生された抗体のサブタイプを解析した結果を示す図であり、（Ａ）は１０倍希釈血清を用いた結果、（Ｂ）は５０倍希釈血清を用いた結果である。
【図２３】ヒト毛乳頭細胞にＯＳＫ－１、ＡＡＰ－１１を作用させ、培養上清中の成長因子濃度を測定した結果を示す図であり、（Ａ）がＫＧＦ、（Ｂ）がＨＧＦ、（Ｃ）がＶＥＧＦの結果である。
【図２４】マウスにおけるＯＳＫ－１の育毛作用を確認した結果を示す図であり、（Ａ）はＤａｙ１７の被毛の長さ、（Ｂ）は発毛スコアの結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
〔ペプチド〕
本発明は、ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチド（以下、これらを単に「本発明のペプチド」ともいう

。）を提供する。本発明のペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列を含んでいればよい。

【００１４】

本発明のペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端側、Ｃ末端側、またはＮ末端側およびＣ末端側に１以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列で示されるペプチドである。本発明のペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端側にＦ、ＩＦ、ＬＩＦ、ＫＬＩＦ、ＬＫＬＩＦ、ＥＬＫＬＩＦ等のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を含んでいてもよい。本発明のペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端側にＫ、ＫＲ、ＫＲＫ、ＫＲＫＬ、ＫＲＫＬＲ、ＫＲＫＬＲＬ、ＫＲＫＬＲＬＷ、ＫＲＫＬＲＬＷＨ、ＫＲＫＬＲＬＷＨＲ、ＫＲＫＬＲＬＷＨＲＫ、ＫＲＫＬＲＬＷＨＲＫＲ、ＫＲＫＬＲＬＷＨＲＫＲＹ等のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を含んでいてもよい。

本発明のペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端側にＫが付加された配列、すなわち、ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号９）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチドが好ましい。配列番号９で示されるアミノ酸配列のＣ末端のＫはＬ体であることがさらに好ましい。

本発明のペプチドは、ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列を含み２３個以下のアミノ酸からなるペプチドであって、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドがさらに好ましい。より好ましくは９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドである。さらに好ましいペプチドとしては、配列番号２、３または６で示されるアミノ酸配列からなるペプチド、およびこれら配列を含むペプチドが含まれる。

本発明のペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列を含み、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫＬＲＬＷＨＲＫＲＹ（配列番号１４）で示されるアミノ酸配列の中の２３個以下のアミノ酸からなるペプチドがさらに好ましい。

【００１５】

本発明のペプチドにアミノ酸の個数の下限値は、１１個であり、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個であってもよい。本発明のペプチドにアミノ酸の個数の上限値は、２３個であり、２２個、２１個、２０個、１９個、１８個、１７個、１６個、１５個、１４個、１３個、１２個、１１個であってもよい。

【００１６】

ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列のＣ末端の『Ｌ』、『ＲＬ』または『ＫＲＬ』が、本発明のペプチドの免疫賦活作用または育毛作用に大きな影響を与える。

ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列のＮ末端の『Ｌ』が、本発明のペプチドの免疫賦活作用または育毛作用に大きな影響を与える。

【００１７】

本発明のペプチドは、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号３）、ＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲ（配列番号６）、ＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号７）、ＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号８）、ＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１０）等で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることがさらに好ましい。

【００１８】

本発明のペプチドは、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号３）、ＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲ（配列番号６）、ＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号７）、ＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号８）、ＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１０）等で示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることが特に好ましい。

本発明のペプチドは、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号３）、ＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲ（配列番号６）、ＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号７）で示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがさらに特に好ましい。

本発明のペプチドは、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲＫ（配列番号２）、ＥＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫ（配列番号３）、ＬＫＬＩＦＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬＫＲ（配列番号６）からなるペプチドであることがさらに特に好ましい。

【００１９】

本発明のペプチドは、Ｃ末端が、カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）、カルボキシレート（－ＣＯＯ$^{-}$）、アミド（－ＣＯＮＨ$_{2}$）またはエステル（－ＣＯＯＲ）のいずれであってもよい。エステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピルもしくはｎ－ブチル等のＣ$_{1-6}$アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等のＣ$_{3-8}$シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフチル等のＣ$_{6-12}$アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル－Ｃ$_{1-2}$アルキル基もしくはα－ナフチルメチル等のα－ナフチル－Ｃ$_{1-2}$アルキル基等のＣ$_{7-14}$アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基等が挙げられる。アミド体としては、アミド、Ｃ$_{1-6}$アルキル基の１つまたは２つで置換されたアミド、フェニル基で置換されたＣ$_{1-6}$のアルキル基の１つまたは２つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで５から７員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。本発明のペプチドがＣ末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチドに含まれる。本発明のペプチドは、Ｃ末端がアミド化されていることが好ましい。

【００２０】

本発明のペプチドは、Ｎ末端のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル等のＣ$_{2-6}$アルカノイル基等のＣ$_{1-6}$アシル基等）で保護されているもの、Ｎ末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、－ＯＨ、－ＳＨ、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル等のＣ$_{2-6}$アルカノイル基等のＣ$_{1-6}$アシル基等）で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドは、Ｎ末端がアセチル化されていることが好ましい。本発明のペプチドは、Ｎ末端がアセチル化され、かつＣ末端がアミド化されていることがさらに好ましい。

【００２１】

本発明のペプチドを構成するアミノ酸は、側鎖が任意の置換基で修飾されていてもよい。置換基は特に限定されないが、例えば、フッ素原子、塩素原子、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アルキル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、リン酸基等が挙げられる。また、側鎖の置換基は、保護基で保護されていてもよい。さらに、糖鎖が結合した糖ペプチドも本発明のペプチドに含まれる。

【００２２】

本発明のペプチドは塩を形成していてもよく、その塩としては、生理学的に許容される塩が好ましい。生理学的に許容される塩としては、例えば、塩酸、硫酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸、硝酸、リン酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸等の酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウム等のアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の、またはアルミニウムの水酸化物または炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、ｔ－ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニン等との塩等が挙げられる。中でも、塩酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩がより好ましい。

【００２３】

本発明のペプチドは、元のペプチドの特性が保持される限り、非天然アミノ酸を含んでもよい。また、本発明のペプチドは、元のペプチドの特性が保持される限り、ペプチドに

他の物質を連結してもよい。ペプチドに連結可能な他の物質としては、例えば、脂質、糖または糖鎖、アセチル基、天然または合成のポリマー等が挙げられる。また、本発明のペプチドは、元のペプチドの特性が保持される限り、ペプチドに、糖鎖付加、側鎖酸化、リン酸化等の修飾を行ってもよい。

【００２４】

本発明のペプチドは、公知の一般的なペプチド合成のプロトコールに従って、固相合成法（Ｆｍｏｃ法、Ｂｏｃ法）または液相合成法により製造することができる。また、本発明のペプチドをコードするＤＮＡを含有する発現ベクターを導入した形質転換体を用いて製造することができる。また、本発明のペプチドを一部に含むペプチドをコードするＤＮＡを含有する発現ベクターを導入した形質転換体を用いてペプチドを取得し、これを適当なプロテアーゼやペプチダーゼで切断することによって製造することができる。また、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写・翻訳系を用いる方法により製造することができる。

【００２５】

本発明のペプチドは、サイトカインの産生誘導作用、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導作用、インフラマソームの活性化作用を有し、免疫賦活剤として有用である。ワクチン用アジュバントとして特に有用である。さらに、本発明のペプチドは、毛乳頭細胞増殖作用、毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進作用等を有し、育毛、養毛、発毛促進に有用である。

【００２６】

〔免疫賦活剤〕

本発明は、上記本発明のペプチドを有効成分として含有する免疫賦活剤を提供する。好適にはワクチン用アジュバントを提供する。さらに本発明は、上記本発明のペプチドを含有するワクチン組成物を提供する。

【００２７】

本発明の免疫賦活剤は、本発明のペプチドを少なくとも一つ含む。免疫賦活のために使用される他の有効成分をさらに含んでいてもよい。本発明のペプチドは、免疫賦活のために使用される他の有効成分と組み合わせて使用することにより、相加的または相乗的な免疫賦活作用の向上が期待できる。

また、本発明の免疫賦活剤は、単独でまたは多剤と併用して各種疾患を治療することができる。たとえば、抗がん剤と併用して治療に用いることができる。

【００２８】

本発明の免疫賦活剤は、例えば、サイトカインの産生誘導作用、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導作用、インフラマソームの活性化作用等を有することにより、優れた免疫賦活作用を示す。また、本発明の免疫賦活剤は、Ｔｈ１タイプ、Ｔｈ２タイプの両方の免疫応答を賦活化する点で有用である。

さらに、本発明の免疫賦活剤は、ワクチン抗原の免疫原性増強作用を有し、優れたワクチン用アジュバントとして好適に用いることができる。

【００２９】

本発明のワクチン用アジュバントは、本発明のペプチドを少なくとも一つ含む。本発明のワクチン用アジュバントは、他のアジュバントまたは免疫賦活のために使用される他の有効成分をさらに含んでいてもよい。本発明のペプチドは、アジュバントまたは免疫賦活のために使用される他の有効成分と組み合わせて使用することにより、相加的または相乗的なアジュバント作用または免疫賦活作用の向上が期待できる。アジュバントまたは免疫賦活のために使用される他の有効成分としては、Ａｌｕｍ、フロイントアジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ Ａｄｊｕｖａｎｔ、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント）、ＴＬＲ賦活剤（クレスチン、リポポリサッカロイド、フラジェリン、ＣｐＧヌクレオチド）等が挙げられる。

【００３０】

また、本発明のワクチン用アジュバントは、少なくとも一つの抗原を含むワクチンと別に包装され、用時混合されるキット製剤であってもよい。

【００３１】
ワクチンは限定されるものではなく、感染症予防ワクチン、がんワクチン、疾患の要因となる生体内タンパク質に対する免疫を誘導するワクチン等の全てのワクチンの免疫原性増強のために、本発明のワクチン用アジュバントを好適に使用することができる。感染症予防ワクチンとしては、インフルエンザ、ポリオ、日本脳炎、結核菌、ヒトパピローマ、マラリア、ＳＡＲＳ、腸チフス、パラチフス、ペスト、百日咳、発疹チフス等の感染症用ワクチンが挙げられる。がんワクチンのがん抗原またはがん抗原ペプチドとしては、例えば、ＷＴ１ペプチド、ＭＡＧＥペプチド、ＭＵＣ１ペプチド、サバイビン、などが挙げられる。疾患の要因となる生体内タンパク質としては、アミロイドβ、アンジオテンシンＩＩ、ＤＰＰＩＶ、ＩｇＥ、ＩＬ－１７、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１などが挙げられる。抗原は、エピトープ配列とキャリアタンパク質（例えばスカシガイヘモシアニン（ＫＬＨ)など）が結合した形態であってもよい。
【００３２】
ワクチン用アジュバントとして特に好ましいペプチドは、配列番号２、３、６、７、８および１０のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、配列番号２、３、６および７のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましく、配列番号２または３で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがさらに好ましい。配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましい。さらに、Ｎ末端がアセチル化され、かつＣ末端がアミド化されているペプチドがより好ましい。本発明のワクチン用アジュバントは、従来のアラムや油性アジュバントと比較して、疼痛や硬結等の好ましくない作用が起こりにくいと考えられる。
【００３３】
また、本発明の免疫賦活剤は、ヒトや他の哺乳動物等の組織や細胞をその体外に取り出して賦活化し、賦活化した組織や細胞を治療等に用いる手法にも好適に用いることができる。例えば、がん患者の単球細胞を取り出し、細胞の増殖因子、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４などを含む培地で培養することにより樹状細胞を誘導し、がん抗原またはがん抗原ペプチドを樹状細胞に取り込ませて体内に戻す治療方法において、がん抗原またはがん抗原ペプチドと共に本発明の免疫賦活剤を使用することができる。その際に、アジュバントまたは免疫賦活のために使用される他の有効成分と組み合わせて使用することができる。がん抗原またはがん抗原ペプチドとしては、例えば、ＷＴ１ペプチド、ＭＡＧＥペプチド、ＭＵＣ１ペプチド、サバイビンなどが挙げられる。
【００３４】
〔ワクチン組成物〕
本発明のワクチン組成物は、少なくとも一つの上記本発明のペプチドと少なくとも一つの抗原を含む。該ワクチン組成物は、少なくとも一つの本発明のペプチドと少なくとも一つの抗原が配合されている製剤の態様、および、少なくとも一つの本発明のペプチドと少なくとも一つの抗原が連結した連結体を含む製剤の態様が含まれる。連結体として、例えば、本発明のペプチドと抗原が１本のポリペプチドとなって連結している態様が挙げられる。当該連結体は、抗原と本発明のペプチドが直接連結されていてもよく、また、スペーサー等を介して連結されてもよい。スペーサーとしては、例えばε-アミノカプロン酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。スペーサーと本発明のペプチドあるいは抗原ペプチドを結合する方法は、アミド結合、ジスルフィド結合を利用することができる。またＰＥＧまたは任意のオリゴペプチドをスペーサーとする方法等が挙げられる。
【００３５】
本発明のワクチン組成物に含まれる抗原は特に限定されない。上述の感染症予防ワクチン、がんワクチン、疾患の要因となる生体内タンパク質に対する免疫を誘導するワクチン等の全てのワクチンに使用可能な抗原であれば、どのような抗原も本発明のワクチン組成物に好適に使用することができる。また、抗原にはエピトープ配列のペプチドを用いることが特に好ましい。抗原はキャリアタンパク質と結合した形態であってもよい。本明細書において、ワクチンの抗原として使用される抗原を「ワクチン抗原」と称する。

【００３６】
〔サイトカインの産生誘導剤、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導剤、インフラマソームの活性化剤〕
本発明の免疫賦活剤は、例えば、サイトカインの産生誘導作用、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導作用、インフラマソームの活性化作用等を有することにより、優れた免疫賦活作用を示す。それゆえ、本発明の免疫賦活剤は、サイトカインの産生誘導剤、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導剤、インフラマソームの活性化剤等を含むものである。
【００３７】
本発明のペプチドのサイトカインの産生誘導作用を確認する方法としては、例えば実施例２および３に記載の方法等が挙げられる。本発明のペプチドのＴ細胞活性化共刺激分子の発現誘導作用を確認する方法としては、例えば実施例４に記載の方法等が挙げられる。本発明のペプチドのインフラマソームの活性化作用を確認する方法としては、例えば実施例５および６に記載の方法等が挙げられる。本発明のペプチドのアジュバント作用を確認する方法としては、例えば上記免疫賦活作用（実施例２～６）および実施例７および８に記載の方法等が挙げられる。
【００３８】
サイトカインの産生誘導剤には、少なくとも一つの本発明のペプチドが含まれる。特に好ましいペプチドは、配列番号２、３、６、７、８および１０のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましい。さらに、Ｎ末端がアセチル化され、かつＣ末端がアミド化されているペプチドがより好ましい。
本明細書において、サイトカインは、例えば、ＩＬ－１β、ＩＬ－１８、ＴＮＦα、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、ＩＬ－１０、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、iＮＯＳ、ＩＬ－１７，ＩＬ－２３等が挙げられ、ＩＬ－１β、ＩＬ－１８、ＴＮＦα、ＩＬ－６等であることが好ましい。
【００３９】
Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現誘導剤には、少なくとも一つの本発明のペプチドが含まれる。特に好ましいペプチドは、配列番号２、３、６、７、８および１０のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、配列番号２、３、６および７のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましく、配列番号２または３で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがさらに好ましい。さらに、Ｎ末端がアセチル化され、かつＣ末端がアミド化されているペプチドがより好ましい。
本明細書において、Ｔ細胞活性化共刺激分子は、例えば、ＣＤ８６、ＣＤ５４、ＣＤ８０、ＣＤ１０６、ＣＤ４０等が挙げられ、ＣＤ８６、ＣＤ５４等であることが好ましい。
【００４０】
インフラマソームの活性化剤には、少なくとも一つの本発明のペプチドが含まれる。特に好ましいペプチドは、配列番号２、３、６、７、８および１０のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましい。さらに、Ｎ末端がアセチル化され、かつＣ末端がアミド化されているペプチドがより好ましい。
【００４１】
本発明の免疫抑制剤、ワクチン用アジュバントまたはワクチン組成物は、上記本発明のペプチドを含有し、薬学的に許容される担体または添加剤を適宜配合して製剤化することができる。具体的には錠剤（糖衣錠を含む）、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口剤；注射剤（例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤）、輸液、点滴剤、外用剤（例えば、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤）、坐剤（例えば、直腸坐剤、膣坐剤）、軟膏、パッチ剤、液剤等の非経口剤とすることができる。
【００４２】
経口用の固形剤（錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等）は、有効成分を賦形剤（

ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合し、常法に従って製剤化することができる。必要に応じて、コーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また２以上の層で被覆していてもよい。

【００４３】

経口用の液剤（水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等）は、有効成分を一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化して製剤化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

【００４４】

非経口剤としては例えば、皮膚外用剤が挙げられる。皮膚外用剤は、液剤、クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤、エアゾール剤等に適用できるが、外用に適する剤型であればこれらに限定されるものではない。

【００４５】

皮膚外用剤には、必要に応じて、水、低級アルコール、溶解補助剤、界面活性剤、乳化安定化剤、ゲル化剤、粘着剤、その他、所望する剤型を得るために通常使用される基剤成分を配合でき、使用目的に応じて血管拡張剤、副腎皮質ホルモン、保湿剤、殺菌剤、清涼化剤、ビタミン類、香料、色素等を本発明の効果を損なわない範囲で適宜に配合することも可能である。

【００４６】

非経口剤としては例えば、注射剤が挙げられる。注射剤は、溶液、懸濁液、乳濁液、および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、有効成分を溶剤に溶解、懸濁または乳化して製剤化される。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート８０（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

【００４７】

本発明の免疫賦活剤、ワクチン用アジュバントおよびワクチン組成物の製剤化に用いる担体または添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体または添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性または油性基剤等の各種担体；賦形剤、結合剤、ｐＨ調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

【００４８】

錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は通常の製剤業務（例えば有効成分を注射用水、天然植物油等の溶媒に溶解または懸濁させる等）に従って調製することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトー

ル、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等）等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０ＴＭ、ＨＣＯ－５０）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。

【００４９】

このようにして得られる製剤は、例えば、ヒトや他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

投与量は、投与対象、対象疾患、投与ルート等により異なるが、例えば、経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき有効成分を約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。例えば、注射剤の形態で非経口的に投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき有効成分を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈内投与する。１日当たりの総投与量は、単一投与量であっても分割投与量であってもよい。

【００５０】

本発明の免疫賦活剤、ワクチン用アジュバントまたはワクチン用組成物の投与方法としては、経皮投与、経粘膜投与、経口投与、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射等が挙げられるが、皮内注射、筋肉内注射がより好ましい。本発明のワクチン用アジュバントとワクチン抗原を併用して投与する場合、ワクチン抗原の投与は、本発明のワクチン用アジュバントと同時に投与してもよく、本発明のワクチン用アジュバントを投与した後にワクチン抗原を投与してもよく、本発明のワクチン用アジュバントを投与する前にワクチン抗原を投与してもよい。

【００５１】

〔育毛剤〕

本発明は、上記本発明のペプチドを有効成分として含有する育毛剤を提供する。本発明の育毛剤は、例えば、毛乳頭細胞増殖作用、毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進作用、養毛作用、発毛促進作用、発毛作用、増毛作用等を有することにより、優れた育毛作用を示す。それゆえ、本発明の育毛剤は、毛乳頭細胞増殖剤、毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進剤、養毛剤、発毛促進剤、発毛剤、増毛剤等と言い換えることができる。本発明の育毛剤は、化粧品、医薬部外品、医薬品、飲食品、サプリメント等の態様で実施することができる。

【００５２】

本発明の育毛剤、毛乳頭細胞増殖剤、毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進剤、養毛剤、発毛促進剤、発毛剤、または、増毛剤は、少なくとも一つの本発明のペプチドを含有する。特に好適なペプチドは、配列番号２、３、６、７および８のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、配列番号２、３、６および７のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましく、配列番号２、３、および６のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましく、配列番号２または３で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがさらに好ましい。配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましい。さらに、Ｎ末端がアセチル化され、かつＣ末端がアミド化されているペプチドがより好ましい。

【００５３】

本明細書において、増殖因子は、例えば、ＫＧＦ（ケラチノサイト増殖因子、ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）、ＨＧＦ（肝細胞増殖因子、ｈｅｐａ

tocyte growth factor）、VEGF（血管内皮細胞増殖因子、vascular endothelial growth factor）、IGF（Insulin growth factor）、EGF（Epithelial growth factor）、FGF（Fibroblast growth factor）、PDGF（Platelet derived growth factor）、TGFβ1(Transforming growth factor β1)等が挙げられ、KGF、HGF、VEGF等であることが好ましい。

【００５４】

本発明の育毛剤が化粧品または医薬部外品の態様である場合、形態は特に限定されない。例えば、皮膚外用剤、シャンプー、コンディショナー、トリートメント、ヘアケア剤、スタイリング剤の形態とすることができる。

【００５５】

本発明の育毛剤が化粧品または医薬部外品の場合、本発明のペプチド以外に化粧品または医薬部外品として一般に使用されている成分、例えば、油分、湿潤剤、保湿剤、乳化剤、紫外線吸収剤、界面活性剤、抗酸化剤、安定化剤、溶解化剤、増粘剤、充填剤、金属イオン封鎖剤、日焼け止め剤、消泡剤、柔軟剤、着色剤、防腐剤、推進剤、酸性化または塩基性化剤、シリコーン、ビタミン、染料、顔料、ナノ顔料、香料、アルコール等の有機溶媒、水等を目的に応じて適宜配合することができる。

【００５６】

化粧品または医薬部外品の好ましい形態として、皮膚外用剤を挙げることができる。皮膚外用剤は、液剤、クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤、エアゾール剤等の剤型が挙げられる、外用に適する剤型であればこれらに限定されるものではない。

皮膚外用剤には、必要に応じて、水、低級アルコール、溶解補助剤、界面活性剤、乳化安定化剤、ゲル化剤、粘着剤、その他、所望する剤型を得るために通常使用される基剤成分を配合でき、使用目的に応じて血管拡張剤、副腎皮質ホルモン、保湿剤、殺菌剤、清涼化剤、ビタミン類、香料、色素等を本発明の効果を損なわない範囲で適宜に配合することも可能である。

【００５７】

本発明の育毛剤が医薬品の態様である場合、上記本発明のペプチドを有効成分とし、薬学的に許容される担体または添加剤を適宜配合して製剤化することができる。剤型は特に限定されず、例えば、錠剤（糖衣錠を含む）、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口剤；注射剤（例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤）、輸液、点滴剤、外用剤（例えば、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤）、坐剤（例えば、直腸坐剤、膣坐剤）、軟膏、パッチ剤、液剤等の非経口剤とすることができる。好適には外用剤である。

【００５８】

非経口剤としては例えば、皮膚外用剤が挙げられる。皮膚外用剤は、液剤、クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤、エアゾール剤等に適用できるが、外用に適する剤型であればこれらに限定されるものではない。

【００５９】

皮膚外用剤には、必要に応じて、水、低級アルコール、溶解補助剤、界面活性剤、乳化安定化剤、ゲル化剤、粘着剤、その他、所望する剤型を得るために通常使用される基剤成分を配合でき、使用目的に応じて血管拡張剤、副腎皮質ホルモン、保湿剤、殺菌剤、清涼化剤、ビタミン類、香料、色素等を本発明の効果を損なわない範囲で適宜に配合することも可能である。

【００６０】

経口用の固形剤（錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等）は、有効成分を賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウ

ム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合し、常法に従って製剤化することができる。必要に応じて、コーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また２以上の層で被覆していてもよい。

【００６１】

経口用の液剤（水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等）は、有効成分を一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化して製剤化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

【００６２】

非経口剤としては例えば、注射剤が挙げられる。注射剤は、溶液、懸濁液、乳濁液、および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、有効成分を溶剤に溶解、懸濁または乳化して製剤化される。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート８０（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

【００６３】

本発明の医薬品の製剤化に用いる担体または添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体または添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性または油性基剤等の各種担体；賦形剤、結合剤、ｐＨ調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

【００６４】

錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は通常の製剤業務（例えば有効成分を注射用水、天然植物油等の溶媒に溶解または懸濁させる等）に従って調製することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等）等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート８０^{TM}、ＨＣＯ－５０）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。

【００６５】

このようにして得られる製剤は、例えば、ヒトや他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

投与量は、投与対象、対象疾患、投与ルート等により異なるが、例えば、皮膚外用剤の

形態で投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき有効成分を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を投与する。経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき有効成分を約０.１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。例えば、注射剤の形態で非経口的に投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき有効成分を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈内投与する。１日当たりの総投与量は、単一投与量であっても分割投与量であってもよい。

【００６６】

本発明の育毛剤が飲食品の態様である場合、飲食品には、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、病者用食品、食品添加物等が含まれる。飲食品の形態は特に限定されない。例えば茶飲料、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料等の飲料、そば、うどん、中華麺、即席麺等の麺類、飴、キャンディー、ガム、チョコレート、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子、パン等の菓子およびパン類、かまぼこ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品、加工乳、発酵乳等の乳製品、サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂および油脂加工食品、ソース、たれ等の調味料、カレー、シチュー、丼、お粥、雑炊等のレトルトパウチ食品、アイスクリーム、シャーベット、かき氷等の冷菓等を挙げることができる。

【００６７】

本発明の育毛剤がサプリメントの態様である場合、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、ドリンク剤等の形態で提供することができる。

【００６８】

サプリメントを製造する際には、例えば、デキストリン、デンプン等の糖類；ゼラチン、大豆タンパク、トウモロコシタンパク等のタンパク質；アラニン、グルタミン、イソロイシン等のアミノ酸類；セルロース、アラビアゴム等の多糖類；大豆油、中鎖脂肪酸トリグリセリド等の油脂類等の任意の助剤を添加して任意の剤形に製剤化することができる。

【００６９】

本発明のペプチドは、育毛または発毛促進のために使用される他の有効成分と組み合わせて使用することにより、相加的または相乗的な育毛または発毛促進作用の向上が期待できる。育毛または発毛促進のために使用される他の有効成分としては、ミノキシジル、フィナステリド等が挙げられる。

【００７０】

本発明には、さらに以下の発明が含まれる。

（ａ）ワクチン用アジュバント、ワクチン組成物、免疫賦活剤または育毛剤を製造するための上記本発明のペプチドの使用。

（ｂ）ワクチン抗原の免疫原性を増強させるため、サイトカインの産生を誘導させるため、Ｔ細胞活性化共刺激分子の発現を誘導させるため、インフラマソームを活性化させるため、毛乳頭細胞を増殖させるため、または毛乳頭細胞に対する増殖因子産生を促進させるための上記本発明のペプチド。

（ｃ）哺乳動物に対して上記本発明のペプチドの有効量を投与することを特徴とする非治療的な免疫賦活または育毛もしくは発毛促進方法。

（ｄ）哺乳動物に対して上記本発明のペプチドの有効量を投与することを特徴とする免疫原性増強、免疫賦活または育毛もしくは発毛促進方法。

（ｅ）ワクチン投与が必要な哺乳動物に対して上記本発明のペプチドの有効量を投与する工程を含むことを特徴とするワクチン抗原の免疫原性増強方法。

（ｆ）育毛もしくは発毛促進が必要な哺乳動物に対して上記本発明のペプチドの有効量を投与する工程を含むことを特徴とする育毛もしくは発毛促進方法。

【実施例】

【００７１】
以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。
【００７２】
〔実施例１：ペプチドの合成〕
文献Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ｐｉｅｒｃｅ（１９８４）、Ｆｍｏｃ ｓｏｌｉｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（２０００）および第５版 実験化学講座１６ 有機化合物の合成ＩＶ等に記載の方法に従い、全自動固相合成機を用いて、保護ペプチド樹脂をＦｍｏｃ法で合成した。得られた保護ペプチド樹脂にトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）とスカベンジャー（チオアニオール、エタンジチオール、フェノール、トリイソプロピルシラン、水等の混合物）を加えて、樹脂から切り出すとともに脱保護して、粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを、逆相ＨＰＬＣカラム（ＯＤＳ）を用いて、０．１％ＴＦＡ－Ｈ２０／ＣＨ３ＣＮの系でグラジエント溶出し、精製を行った。目的物を含む画分を集め凍結乾燥して、目的のペプチドを得た。合成したペプチドのアミノ酸配列は、アミノ酸シーケンサーＧ１０００Ａ（Ｈｅｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ）、ＰＰＳＱ－２３Ａ（島津製作所）またはＰｒｏｃｉｓｃＬＣ（ＡＢＩ社）を用いて確認し、得られたペプチドのＮ末端をアセチル化およびＣ末端をアミド化した。合成したペプチドの配列を以下に示した。
【００７３】
合成したＯＳＫ－１の分子量を質量分析装置（Ｖｏｙａｇｅｒ ＤＥ－Ｐｒｏ ｓｅｒｉａｌ ｎｕｍｂｅｒ ６３４４）を用いて測定した。マトリックスとしてｄｉｈｙｄｒｏｘｙｂｅｎｚｏｉｃ ａｃｉｄ（ＤＨＢ）を使用し、マトリックス０．５μＬとサンプル０．５μＬをスポットし、乾燥した。ＭＳ解析の結果を図１３に示した。
合成したＯＳＫ－１の純度をＨＰＬＣ装置により以下の分析条件で測定した。
ＨＰＬＣ機種：Ｗａｔｅｒｓ Ａｌｌｉａｎｃｅ ２６９０
試料溶液：１ｍｇ／ｍＬ水溶液
注入量：２０μＬ
測定波長：２１５ｎｍ
流量：毎分１．２ｍＬ
カラム：Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ｃ１８，４．６ｍｍ×２５０ｍｍ，５ｍｉｃｒｏｎ
カラム温度：室温
移動相Ａ：０．１％トリフルオロ酢酸水溶液
移動相Ｂ：０．１％トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液
グラジエント条件：２０分間で移動相Ｂの濃度を直線的勾配で２５％から４５％にする。（２５→４５％ ｂｕｆｆｅｒ Ｂ ｉｎ ２０ｍｉｎ）
ＨＰＬＣ解析の結果を図１４に示した。
【００７４】

【表１】

ペプチド	N末端	アミノ酸配列																			配列番号	C末端
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
OSK−1	Acetyl	E	L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L	K	R	K	配列番号2	amide
AAP−1	Acetyl	E	L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L	K			配列番号3	amide
AAP−4	Acetyl		L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L	K	R		配列番号6	amide
AAP−5	Acetyl			K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L	K			配列番号7	amide
AAP−6	Acetyl				L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L				配列番号8	amide
AAP−11	Acetyl						F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L				配列番号10	amide
AAP−2	Acetyl	E	L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R					配列番号4	amide
AAP−3	Acetyl	E	L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R							配列番号5	amide
AAP−12	Acetyl								H	R	L	K	R	L	R	K	R	L	K	R	K	配列番号11	amide

【００７５】

〔実施例２：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ−１細胞）におけるサイトカイン産生に対する影響（１）〕

（１）実験方法

ヒト単球系株化細胞ＴＨＰ−１細胞（ＪＣＲＢ登録番号：ＪＣＲＢ０１１２）を１μｇ／ｍＬリポポリサッカライド（ＬＰＳ）および１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地に1×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように懸濁し、３時間、CO_2インキュベータ内で静置しプライミングした。細胞懸濁液を遠心し、ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）に1×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように再懸濁し、２４ウェルプレートに５００μＬ／ｗｅｌｌで播種した。別途最終濃度の２倍濃度になるようにＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ）で調製したＯＳＫ−１溶液を５００μＬ／ｗｅｌｌで添加した。約１６時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【００７６】

（２）結果

培養上清中のＩＬ−１β、ＩＬ−１８、ＴＮＦαおよびＩＬ−６濃度を測定した結果を図１（Ａ）〜（Ｄ）に示した。

ＬＰＳでプライミングしたＴＨＰ−１細胞に対してＯＳＫ−１を添加すると、濃度依存的にサイトカインの産生が誘導されることを確認した。

【００７７】

〔実施例３：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ−１細胞）におけるサイトカイン産生に対する影響（２）〕

（１）実験方法

ＴＨＰ−１細胞を５０ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡ（ｐｈｏｒｂｏｌ　１２−ｍｙｒｉｓｔａｔｅ　１３−ａｃｅｔａｔｅ）および１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地に5×10^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレートに5×10^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌになるように播種した。CO_2インキュベータ内で２日間培養し、マクロファージに分化させた。２日後、培地を除き、ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）で調製したＯＳＫ−１溶液をウェルに添加し、さらに一晩培養した。１６時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【００７８】

（２）結果

培養上清中のＩＬ−１β、ＩＬ−１８、ＴＮＦαおよびＩＬ−６濃度を測定した結果を図２（Ａ）〜（Ｄ）に示した。

ＰＭＡで分化したＴＨＰ−１細胞にＯＳＫ−１を添加すると、３０μｇ／ｍＬの濃度において強いサイトカイン産生誘導作用が認められた。

【００７９】

〔実施例４：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ−１細胞）におけるＣＤ８６およびＣＤ５４発現

に対する影響〕
（１）実験方法
ＴＨＰ－１細胞は、１０％ＦＢＳおよび０．０５ｍＭメルカプトエタノール含有ＲＰＭＩ１６４０培地を用いて７５ｃｍ^{2}フラスコに２．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの密度で５０ｍＬ添加し、４８時間前培養した。
前培養したＴＨＰ－１細胞を遠心回収し、１０％ＦＢＳおよび０．０５ｍＭメルカプトエタノール含有ＲＰＭＩ１６４０培地を用いて２．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞懸濁液を調製し、２４ウェルプレートの各ウェルに５００μＬを播種した。細胞懸濁液を播種した各ウェルに、同培地を用いて調製したペプチドを５００μＬ添加した。
一晩培養後、細胞を遠心回収し、０．１％ＢＳＡ含有ＰＢＳ（ＦＡＣＳバッファー)による洗浄を２回繰り返した。その後、６００μＬの０．０１％ヒトγグロブリン溶液（Ｓｉｇｍａ，Ｇ２３８８）含有ＦＡＣＳバッファーに分散して４℃、１０分間インキュベートし、Ｆｃレセプターのブロッキングを行った。
その後、細胞懸濁液を、抗体反応用に１８０μＬずつ３分割して１．５ｍＬチューブに分注した後、遠心回収したペレットに対し、ＣＤ８６抗体（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ；Ｃａｔ＃　５５５６５７）、ＣＤ５４抗体（Ｄａｋｏ；Ｃａｔ＃　Ｆ７１４３）およびｉｓｏｔｙｐｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ）抗体（Ｄａｋｏ；Ｃａｔ＃　Ｘ０９２７）の各ＦＩＴＣ標識抗体液をＦＡＣＳバッファーで適正濃度に調製した液５０μＬを添加し、４℃で３０分間インキュベートした。３０分間インキュベーション後、細胞を遠心回収し、ＦＡＣＳバッファーによる洗浄を２回繰り返した。遠心回収した細胞を０．６２５μｇ／ｍＬ　Ｐｒｏｐｉｄｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ含有ＦＡＣＳバッファー２００μＬに分散し、フローサイトメトリーにて生細胞１×１０^{4}ｃｅｌｌｓを測定し、細胞表面抗原の発現量を測定した。前方散乱および側方散乱によるゲーティングは行わず、測定した平均蛍光強度（ＭＦＩ）から、下に示す式で相対蛍光強度（ＲＦＩ）を算出した。
【００８０】
【数１】

$$RFI\ (\%) = \frac{\text{被験物質処理細胞の MFI} - \text{被験物質処理細胞の isotype control の MFI}}{\text{溶媒処理細胞の MFI} - \text{溶媒処理細胞の isotype control の MFI}} \times 100$$

(MFI = Geometric Mean fluorescence intensity)

【００８１】
（２）結果
ＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１、ＡＡＰ－１～ＡＡＰ－６を添加したときのＣＤ８６およびＣＤ５４の発現量を図３（Ａ）、（Ｂ）に示した。
ＯＳＫ－１をＴＨＰ－１細胞に添加したとき、強いＣＤ８６およびＣＤ５４発現誘導活性が認められた。ＯＳＫ－１の配列からＣ末端のアミノ酸（ＬＫＲＫまたはＫＲＬＫＲＫ）を欠損させた配列（ＡＡＰ－２～ＡＡＰ－３）において、アミノ酸数が少なくなるに従い、ＣＤ８６およびＣＤ５４発現誘導活性が大きく低下する傾向が認められた。特にＣＤ５４で顕著であった。ＯＳＫ－１のＣ末端から２アミノ酸を欠損させた配列（ＡＡＰ－１）、ならびにＯＳＫ－１のＮ末端およびＣ末端からそれぞれ１アミノ酸ずつ欠損させた配列（ＡＡＰ－４～ＡＡＰ－６）については、大きな活性低下は認められなかった。ＯＳＫ－１は、アジュバント活性をもつムラミルジペプチド（ＭＤＰ）と比較して同等かそれ以上の発現誘導活性を有することが確認された（図９および図１０）。以上より、ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列のＣ末端の『Ｌ』が、本発明のペプチドの免疫賦活作用に必要であることが示唆された。
【００８２】
ＴＨＰ－１細胞にＡＡＰ－６、ＡＡＰ－１１およびＡＡＰ－１２を添加したときのＣＤ８６およびＣＤ５４の発現量を図４（Ａ）、（Ｂ）に示した。
ＯＳＫ－１の配列Ｎ末端から７アミノ酸を欠損させた配列（ＡＡＰ－１２）において、ＣＤ８６およびＣＤ５４発現誘導活性が大きく低下する傾向が認められた。ＯＳＫ－１の

Ｎ末端およびＣ末端から３アミノ酸欠損させた配列（ＡＡＰ－６）、ＯＳＫ－１のＮ末端から５アミノ酸およびＣ末端から３アミノ酸欠損させた配列（ＡＡＰ－１１）については、大きな活性低下は認められなかった（図１１および図１２）。以上より、ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列のＮ末端の『Ｌ』が、本発明のペプチドの免疫賦活作用に必要であることが示唆された。

【００８３】

〔実施例５：ＯＳＫ－１によるインフラマソーム活性化作用（１）〕

（１）実験方法

ＴＨＰ－１細胞に、インフラマソーム構成分子であるＮＬＲＰ３（ＮＯＤ－ｌｉｋｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｆａｍｉｌｙ，ｐｙｒｉｎ ｄｏｍａｉｎ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ３）に対するｓｉＲＮＡ（終濃度１００ｎＭ、Ｈｓ＿ＣＩＡＳ１＿６およびＨｓ＿ＣＩＡＳ１＿９、ＱＩＡＧＥＮ社製）、またはｃｏｎｔｒｏｌ ｓｉＲＮＡを、トランスフェクション試薬（６μＬ／ｗｅｌｌ、ＨｉＰｅｒｆｅｃｔ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ、ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いて、トランスフェクションし一晩培養後、ＮＬＲＰ３の発現レベルをウェスタンブロット法により確認した。

【００８４】

このＴＨＰ－１細胞を１μｇ／ｍＬ ＬＰＳおよび１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように懸濁し、３時間、CO_2インキュベータ内で静置しプライミングした。細胞懸濁液を遠心し、ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ）に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ再懸濁後、２４ウェルプレートに５００μＬ／ｗｅｌｌで添加し、最終濃度の２倍濃度になるようにＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ）で調製したＯＳＫ－１溶液を５００μＬ添加した。１６時間後に培養上清を回収し、上清中のＩＬ－１βおよびＴＮＦα濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【００８５】

（２）結果

ＮＬＲＰ３の発現レベルをウェスタンブロット法により確認した結果を図５に示した。ＴＨＰ－１細胞に、ＮＬＲＰ３に対するｓｉＲＮＡをＴＨＰ－１細胞にトランスフェクションすることにより、ＮＬＲＰ３の発現をノックダウンしたことが確認された。

【００８６】

このＴＨＰ－１細胞を用いて、ＯＳＫ－１を１０μｇ／ｍＬの濃度で添加したときのＩＬ－１βおよびＴＮＦα産生量を比較した結果を図６（Ａ）、（Ｂ）に示した。ＮＬＲＰ３発現をノックダウンしていない（ｃｏｎｔｒｏｌ ｓｉＲＮＡをトランスフェクションした）細胞ではＯＳＫ－１によるＩＬ－１β産生誘導が認められたが、ＮＬＲＰ３発現をノックダウンした細胞ではＯＳＫ－１によるＩＬ－１β産生誘導は抑制された。一方、インフラマソームの活性化に関与しないＴＮＦαについては、ＮＬＲＰ３発現のノックダウンの有無にかかわらず、ＯＳＫ－１による産生誘導が認められた。

【００８７】

〔実施例６：ＯＳＫ－１によるインフラマソーム活性化作用（２）〕

（１）実験方法

ＴＨＰ－１細胞を１μｇ／ｍＬ ＬＰＳおよび１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように懸濁し、３時間、CO_2インキュベータ内で静置しプライミングした。細胞懸濁液を遠心し、ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ再懸濁後９６ウェルプレートに１００μＬ／ｗｅｌｌで播種した。カテプシンＢの阻害剤であるＣａ－０７４－Ｍｅ（終濃度１０μＭ）、カスペース-１の阻害剤Ｚ－ＹＶＡＤ－ＦＭＫ（終濃度１０μＭ）または培地を添加し、さらにＯＳＫ－１または培地を添加後、ＣＯ２インキュベータ内で培養した。１６時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【００８８】

（２）結果

ＬＰＳによるＴＨＰ－１細胞のプライミングの有無による、ＯＳＫ－１のＩＬ－１β産

生作用を比較した結果を図７に示した。ＬＰＳによりプライミングした場合のみＯＳＫ－１によるＩＬ－１βの産生が認められた。

【００８９】

カテプシンＢの阻害剤およびカスペース-１の阻害剤の有無による、ＯＳＫ－１のＩＬ－１β産生作用を比較した結果を図８に示した。ＯＳＫ－１によるＩＬ－１βの産生誘導は、インフラマソームを活性化するカテプシンＢの阻害剤であるＣａ－０７４－Ｍｅ、または、インフラマソーム構成分子であるカスペース-１の阻害剤であるＺ－ＹＶＡＤ－ＦＭＫにより抑制されることを確認した。

【００９０】

以上より、ＬＰＳプライミングにより発現したｐｒｏＩＬ－１βが、ＯＳＫ－１により活性化されたインフラマソームの構成分子であるカスペース－１により、ＩＬ－１βにプロセシングされて細胞外に放出されたことが示唆された。

【００９１】

〔実施例７：イヌにおけるＯＳＫ－１のアジュバント（ワクチン抗原の免疫原性増強）効果の確認〕

（１）実験方法

イヌにおけるＯＳＫ－１のアジュバント効果を既存のフロイントアジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ　Ａｄｊｕｖａｎｔ）のアジュバント効果と比較した。ワクチンとしてＡｎｇＩＩ－ＫＬＨ（Ａｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎ　ＩＩ　Ｋｅｙｈｏｌｅ　ｌｉｍｐｅｔ　ｈｅｍｏｃｙａｎｉｎ）（２５μｇ／匹）を、また、アジュバントとしてＯＳＫ－１（５００μｇ／匹）またはフロイントアジュバント（２５０μＬ／匹）を用いて、２週間隔で２回、ビーグル犬に皮内投与した（１群２匹）。ただし、フロイントアジュバント群は、１回目の投与には完全フロイントアジュバントを、２回目の投与には不完全フロイントアジュバントを使用した。投与前、および、１回目の投与から２週後、４週後に採血し、ＡｎｇＩＩに対する抗体価を測定した。

ＡｎｇＩＩ－ＢＳＡでコーティングしたＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに、５％スキムミルク／ＰＢＳを用いて段階希釈した血清を添加し、４℃、一晩静置した。ＰＢＳ－Ｔでウェルを洗浄後、５％スキムミルク／ＰＢＳにて希釈したＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ抗体を添加し、室温で３時間振とうした。ＰＢＳ－Ｔでウェルを洗浄後、ＴＭＢ溶液を添加して遮光で３０分間静置し、０．５Ｎ　H_2SO_4を加えて反応を停止した。４５０ｎｍの吸光度を測定し、抗体価を比較した。

【００９２】

（２）結果

結果を図９に示した。（Ａ）がＯＳＫ－１群の結果、（Ｂ）がフロイントアジュバント（ＦＡ）群の結果である。ＯＳＫ－１群の個体でＡｎｇＩＩ抗体価の上昇が認められた。

【００９３】

〔実施例８：マウスにおけるＯＳＫ－１のアジュバント（ワクチン抗原の免疫原性増強）効果の確認〕

【００９４】

（１）実験方法

マウスにおけるＯＳＫ－１のアジュバント効果をＡｌｕｍおよびフロイントアジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ　Ａｄｊｕｖａｎｔ）のアジュバント効果と比較した。ワクチンとしてＡｎｇＩＩ－ＫＬＨ（２μｇ／匹）を、アジュバントとしてＯＳＫ－１（１００μｇ／匹）、Ａｌｕｍ（４００μｇ／匹）またはフロイントアジュバント（５０μｇ／匹）を用いて、２週間隔で３回、Ｃ５７／ＢＬ６マウスに皮内投与した（１群３匹）。ただし、フロイントアジュバント群は、１回目の投与には完全フロイントアジュバントを、２回目および３回目の投与には不完全フロイントアジュバントを使用した。投与前、および、１回目の投与から２週後、４週後、６週後、８週後に採血し、ＡｎｇＩＩに対する抗体価を測定した。

抗体価の測定は、実施例７と同様の方法で行った。

【００９５】
（２）結果
ＯＳＫ－１、Ａｌｕｍ、フロイントアジュバント（ＦＡ）のアジュバント効果を比較した結果を図１０に示した。ＯＳＫ－１群においてフロイントアジュバント（ＦＡ）群には及ばないものの、Ａｌｕｍ群と同程度のＡｎｇＩＩに対する抗体価の上昇が認められた。
【００９６】
〔実施例９：毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進作用（１）〕
（１）実験方法
ヒト毛乳頭細胞を、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を用いて3×10^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌになるように２４ウェルプレートに播種し、一晩CO_2インキュベータ内で培養した。翌日、培地を除去し、１％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を用いて調製したペプチド溶液を添加し５日間CO_2インキュベータ内で培養した。培養上清を回収し、ＫＧＦ、ＨＧＦおよびＶＥＧＦの濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。
【００９７】
（２）結果
ヒト毛乳頭細胞に各種ペプチドを作用させたときの、培養上清中のＫＧＦ、ＨＧＦ、ＶＥＧＦ濃度をＥＬＩＳＡにより測定した結果を図１１（Ａ）～（Ｃ）に示した。ＯＳＫ－１は濃度依存的に各増殖因子の産生を促進することが確認された。ＡＡＰ－１、ＡＡＰ－４～ＡＡＰ－６についても、ＯＳＫ－１と同様、濃度依存的に各増殖因子の産生作用が認められた。ＯＳＫ－１の配列からＣ末端のアミノ酸（ＬＫＲＫまたはＫＲＬＫＲＫ）を欠損させた配列（ＡＡＰ－２およびＡＡＰ－３）において、各増殖因子の産生作用が低下した。特にＨＧＦの産生促進作用が低下した。以上より、ＬＨＲＬＫＲＬＲＫＲＬ（配列番号１）で示されるアミノ酸配列のＣ末端の『Ｌ』が、本発明のペプチドの増殖因子産生促進作用に必要であることが示唆された。
【００９８】
〔実施例１０：ＯＳＫ－１と類似ペプチド（ＳＲ－０７およびＳＲ－０８）のＣＤ５４発現誘導作用の比較〕
ＯＳＫ－１と類似ペプチド（ＳＲ－０７およびＳＲ－０８）のＣＤ５４発現誘導作用を比較した。実験方法は、実施例４と同様に行った。ＳＲ－０７およびＳＲ－０８はＷＯ２０１０／１３７５９４に記載されているペプチドであり配列を以下の表２に示す。
【００９９】
【表２】

ペプチド	N末端	アミノ酸配列																				配列番号	C末端
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
OSK－1	Acetyl	E	L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	L	R	K	R	L	K	R	K	配列番号2	amide
SR－07		M	L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	M	R	K	R	L	dK	R	K	配列番号12	
SR－08			L	K	L	I	F	L	H	R	L	K	R	M	R	K	R	L	dK	R	K	配列番号13	amide

*dK：D体

【０１００】
試料未処理コントロール細胞（溶媒処理細胞）の生存率が９０％以上を示すとき試験成立とし、試験実施時の各試料濃度における細胞生存率が５０％より低い場合は、その濃度におけるＣＤ５４の値は判定から除外とした。
結果を図１２に示した。ＳＲ－０７およびＳＲ－０８に比較して、ＯＳＫ－１に強いＣＤ５４発現誘導活性が認められた。
【０１０１】
〔実施例１１：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ－１細胞）におけるサイトカイン産生に対する影響（３）〕
（１）実験方法
実施例３と同じ方法で実験を行い、培養上清中の培養上清中のＩＬ－１β、ＩＬ－１８

、ＴＮＦα、ＩＬ－６、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ－１αおよびＭＩＰ－１β濃度を測定した。

（２）結果

結果を図１５（Ａ）～（Ｇ）に示した。ＰＭＡで分化したＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１を添加すると、ＯＳＫ－１濃度依存的なケモカイン、サイトカインの産生誘導作用が認められた。

【０１０２】

〔実施例１２：マウスマクロファージ細胞（ＲＡＷ２６４．７細胞）におけるサイトカイン産生に対する影響〕

（１）実験方法

ＲＡＷ２６４．７細胞を５０ｎｇ／ｍＬ　ＬＰＳおよび１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように懸濁し、３時間、CO_2インキュベータ内で静置しプライミングした。細胞懸濁液を遠心し、ＤＭＥＭ培地（１０％ＦＢＳ含有）に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように再懸濁し、２４ウェルプレートに５００μＬ／ｗｅｌｌで播種した。別途最終濃度の２倍濃度になるようにＤＭＥＭ培地（１０％ＦＢＳ含有）で調製したＯＳＫ－１溶液を５００μＬ／ｗｅｌｌで添加した。約１６時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【０１０３】

（２）結果

培養上清中のＩＬ－１β、ＩＬ－１８、ＴＮＦαおよびＩＬ－６濃度を測定した結果を図１６（Ａ）～（Ｄ）に示した。

ＬＰＳでプライミングしたＲＡＷ２６４．７細胞に対してＯＳＫ－１を添加すると、ＯＳＫ－１濃度依存的なサイトカインの産生誘導が認められた。

【０１０４】

〔実施例１３：マウス骨髄由来樹状細胞におけるサイトカイン産生に対する影響〕

（１）実験方法

Ｃ５７ＢＬ／６マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、骨髄細胞を２０ｍｇ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦ（Ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ　Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ　ｃｏｌｏｎｙ－ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ　Ｆａｃｔｏｒ）および１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地に播種し、３日間培養した。培養３日後に培地を追加し、さらに４日間培養した。培養プレートに接着していない細胞を回収し骨髄由来樹状細胞とした。ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）で２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように細胞懸濁液を調整し、２４ウェルプレートに５００μＬ／ｗｅｌｌで播種した。別途最終濃度の２倍になるようにＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）で調製したＯＳＫ－１溶液を５００μＬ／ｗｅｌｌで添加した。約１６時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【０１０５】

（２）結果

培養上清中のＩＬ－１β、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－６およびＩＬ－１２ｐ７０濃度を測定した結果を図１７（Ａ）～（Ｅ）に示した。

マウス骨髄由来樹状細胞に対してＯＳＫ－１を添加すると、ＯＳＫ－１濃度依存的なサイトカインの産生誘導が認められた。

【０１０６】

〔実施例１４：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ－１細胞）におけるサイトカイン産生に対する影響（Ａｌｕｍ、ＣｐＧヌクレオチドとの比較）〕

（１）実験方法

ＴＨＰ－１細胞を１μｇ／ｍＬ　ＬＰＳおよび１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように懸濁し、３時間、CO_2インキュベータ内で静地しプライミングした。細胞懸濁液を遠心し、ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）に１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように再懸濁し、２４ウェルプレートに５００

μＬ／ｗｅｌｌで播種した。別途最終濃度の２倍濃度になるようにＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）で調製したＯＳＫ－１、Ａｌｕｍ（Ａｌｈｙｄｒｏｇｅｌ　２％、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）またはＣｐＧヌクレオチド（ＣｐＧ　ＯＤＮ　２００６、Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）溶液を５００μＬ／ｗｅｌｌで添加した。約１６時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【０１０７】

（２）結果

培養上清中のＩＬ－１β、ＩＬ－１８、ＴＮＦα、ＩＬ－６濃度を測定した結果を図１８（Ａ）～（Ｄ）に示した。

ＬＰＳでプライミングしたＴＨＰ－１細胞に対してＯＳＫ－１を添加すると、ＡｌｕｍおよびＣｐＧヌクレオチドと比較してＩＬ－１β、ＩＬ－１８およびＴＮＦαの強い産生誘導作用が認められた。ＩＬ－１８については、Ａｌｕｍよりも弱いが、ＯＳＫ－１は有意な産生誘導が認められた。

【０１０８】

〔実施例１５：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ－１細胞）におけるＣＤ８６およびＣＤ５４発現に対する影響（Ａｌｕｍとの比較）〕

（１）実験方法

ペプチドとしてＯＳＫ－１を用い、対照としてＡｌｕｍを用いたこと以外は、実施例４と同じ方法で実験を行った。

（２）結果

ＴＨＰ－１細胞にＯＳＫ－１またはＡｌｕｍを添加したときのＣＤ８６およびＣＤ５４の発現量を図１９（Ａ）、（Ｂ）に示した。

ＯＳＫ－１をＴＨＰ－１細胞に添加したとき、強いＣＤ８６およびＣＤ５４発現誘導活性が認められた。一方、ＡｌｕｍをＴＨＰ－１細胞に添加したとき、ＣＤ８６およびＣＤ５４発現誘導活性は認められなかった。

【０１０９】

〔実施例１６：ヒト単球系細胞株（ＴＨＰ－１細胞）におけるＯＳＫ－１によるＮＦκＢの活性化〕

（１）実験方法

ＴＨＰ－１細胞をＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）を用いて5×10^{5}ｃｅｌｌｓ／５００μＬになるように調整し、２４ウェルプレートに５００μＬ／ｗｅｌｌで播種した。ＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）で調製したＱＮＺ（Ｅｎｚｏ、最終濃度１０μＭ）、ＢＡＹ１１－７０８２（Ｅｎｚｏ、最終濃度１０μＭ）またはＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）を添加して２．５時間培養した。最終濃度が１００ｎｇ/ｍＬになるようにＯＳＫ－１を添加して２時間培養後に培養上清を回収し、上清中のＴＮＦα濃度をＥＬＩＳＡにより測定した。

【０１１０】

（２）結果

結果を図２０に示した。ＯＳＫ－１はＴＨＰ－１細胞においてＴＮＦαの産生を誘導したが、ＮＦκＢ阻害剤であるＱＮＺまたはＢＡＹ１１－７０８２を添加するとＯＳＫ－１によるＴＮＦαの産生が抑制された。この結果から、ＯＳＫ－１はＮＦκＢ活性化作用を有することが確認された。

【０１１１】

〔実施例１７：ＯＳＫ－１－ＡｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎＩＩ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ　ｖａｃｃｉｎｅによる抗体産生〕

（１）実験方法

ＯＳＫ－１ペプチドとＡｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎＩＩペプチドを、ε－Ａｃｐをスペーサーとしてコンジュゲートした「ＯＳＫ－１－ＡｎｇＩＩ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ　ｖａｃｃｉｎｅ」を作製し、マウスを用いて抗体産生作用を評価した。群構成は、（１）ＡｎｇＩＩ－ＫＬＨ（５μｇ／ｍｏｕｓｅ）＋Ａｌｕｍ（Ａｌｈｙｄｒｏｇｅｌ　２％、Ｉｎｖｉ

ｖｏＧｅｎ、０．４ｍｇ／ｍｏｕｓｅ）、（２）ＯＳＫ－１－ＡｎｇＩＩ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅ（１０μｇ／ｍｏｕｓｅ）、（３）ＯＳＫ－１－ＡｎｇＩＩ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅ（５０μｇ／ｍｏｕｓｅ）の３群とし、２週間隔で３回、Ｂａｌｂ／ｃマウスに皮内投与した（各群６匹）。投与前および１回目の投与から２週後、４週後、６週後、８週後に採血し、ＡｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎＩＩに対する抗体価をＥＬＩＳＡにより測定した。さらに、産生された抗体のＩｇＧサブタイプについてＥＬＩＳＡにより解析した。

【０１１２】

（２）結果

ＡｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎＩＩに対する抗体価の測定結果を図２１に示し、産生された抗体のＩｇＧサブタイプの解析結果は図２２（Ａ）、（Ｂ）に示した。

ＯＳＫ－１－ＡｎｇＩＩ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅは濃度依存的にＡｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎＩＩに対する抗体産生を誘導した。

ＩｇＧサブタイプの解析では、Ｔｈ２タイプのアジュバントとされるＡｌｕｍと共に投与されたＡｎｇＩＩ－ＫＬＨ ｖａｃｃｉｎｅにより産生された抗体においてはＴｈ２タイプであるＩｇＧ１の産生が高かったが、ＯＳＫ－１－ＡｎｇＩＩ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅにより産生された抗体においては、Ｔｈ２タイプのＩｇＧ１だけでなくＴｈ１タイプであるＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂおよびＩｇＧ３の産生も高かった。

【０１１３】

〔実施例１８：ＯＳＫ－１－ＷＴ１ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅによるＷＴ１特異的免疫誘導〕

（１）実験方法

ＯＳＫ－１ペプチドとＷＴ１ペプチドを、ε－Ａｃｐをスペーサーとしてコンジュゲートした「ＯＳＫ－１－ＷＴ１ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅ」を作製し、マウスを用いてＷＴ１特異的な免疫誘導能を評価した。群構成は（１）生理食塩水、（２）ＷＴ１ ｐｅｐｔｉｄｅ（１５μｇ／ｍｏｕｓｅ）＋Ｉｎｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ Ａｄｊｕｖａｎｔ（ＩＦＡ、ＳＩＧＭＡ；Ｃａｔ＃Ｆ５５０６、５０μＬ／ｍｏｕｓｅ）、（３）ＷＴ１ ｐｅｐｔｉｄｅ（１５μｇ／ｍｏｕｓｅ）＋ＯＳＫ－１（１００μｇ／ｍｏｕｓｅ）、（４）ＯＳＫ－１－ＷＴ１ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅ（５０μｇ／ｍｏｕｓｅ）、（５）ＯＳＫ－１－ＷＴ１ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｖａｃｃｉｎｅ（３００μｇ／ｍｏｕｓｅ）の５群とした（各群３匹）。Ｃ５７ＢＬ／６マウスにワクチンを週に１回、４週間投与し、４回目の投与から２週間後に免疫したマウスから脾臓を摘出しＥＬＩＳｐｏｔアッセイを行った。すなわち、摘出した脾臓から脾細胞を調製し、抗ＩＬ－４抗体または抗ＩＦＮγ抗体をコーティングしたフィルタープレートに脾細胞を播種した。ＷＴ１ペプチドまたはＯＳＫ－１－ＷＴ１ペプチドを添加して３日間培養後、フィルタープレートのウェルを染色し、ＩＬ－４またはＩＦＮγ産生細胞のスポット数を計測した。

【０１１４】

（２）結果

ＯＳＫ－１をアジュバントとして添加した群（３）、および、ＯＳＫ－１とＷＴ１をコンジュゲートした群（４）および群（５）では、ＷＴ１ペプチド刺激に対してＩＦＮγを産生する細胞が多く認められた。特に群（５）で反応性が高かった。一方、ＩＦＡをアジュバントとして添加した群（２）では、ＷＴ１ペプチドの刺激に反応してＩＬ－４を産生する細胞が多く認められた。

【０１１５】

〔実施例１９：毛乳頭細胞に対する増殖因子産生促進作用（２）〕

（１）実験方法

ペプチドとしてＯＳＫ－１およびＡＡＰ－１１を用い、実施例９と同じ方法でＫＧＦ、ＨＧＦおよびＶＥＧＦの濃度を測定した。

（２）

結果を図２３に示した。ＡＡＰ－１１は濃度依存的に各増殖因子の産生を促進した。

【０１１６】

〔実施例２０：ＯＳＫ－１の育毛作用〕

（１）実験方法

毛休止期にある８週齢の雄性Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスの背部を傷付けないようにバリカンおよびシェーバー剃毛した。剃毛領域の面積は２×４ｃｍとした。剃毛３日後から１日１回１４日間、０．０２％（ｗ／ｖ）、０．１％（ｗ／ｖ）または０．５％（ｗ／ｖ）のＯＳＫ－１溶液を１００μＬずつ塗布した。対照群には生理食塩水、陽性対照群には３％（ｗ／ｖ）ミノキシジルを塗布した。剃毛日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ３、Ｄａｙ７、Ｄａｙ１０、Ｄａｙ１４およびＤａｙ１７にマウス剃毛部の全面積に対する発毛部位の面積を「０％：スコア０」、「～２０％：スコア１」、「～４０％：スコア２」、「～６０％：スコア３」、「～８０％：スコア４」、「～１００％：スコア５」としてスコア化した。また、Ｄａｙ１７にマウスの剃毛部に生えている被毛を１０本抜き取り、実体顕微鏡を用いてこれら被毛の長さを測定し、その合計値を各個体の毛の長さ（ｍｍ）とした。

【０１１７】

（２）結果

結果を図２４に示した。（Ａ）はＤａｙ１７の被毛の長さ、（Ｂ）は発毛面積スコアの結果である。ＯＳＫ－１は濃度依存的に育毛を促進することが明らかになった。また、０．５％ＯＳＫ－１群の発毛スコアおよび毛の長さは、３％ミノキシジル群とほぼ同等であった。

【０１１８】

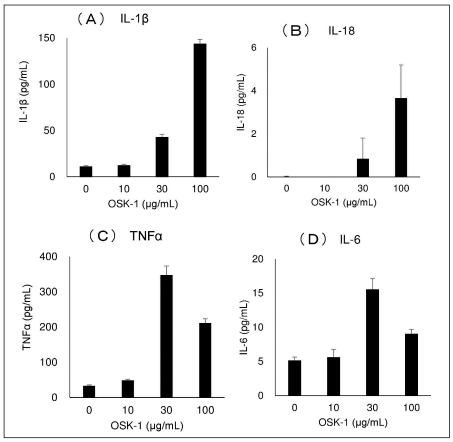
なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【産業上の利用可能性】

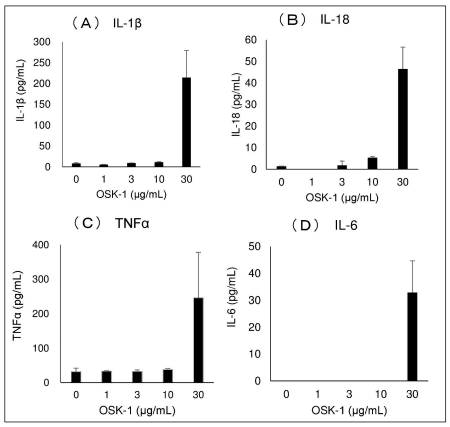
【０１１９】

本発明のペプチドは、免疫賦活作用を有することより、免疫賦活剤として使用できる。好適には、ワクチン用アジュバントとして使用できる。また、本発明のペプチドを含有するワクチン組成物はより効果のある治療を可能にする。さらに、本発明のペプチドは育毛または発毛促進を目的とする化粧品、医薬部外品、医薬品、飲食品、サプリメントの成分として好適に使用できる。

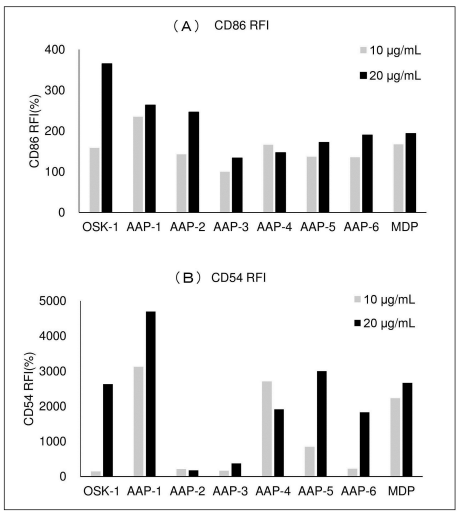
【図１】



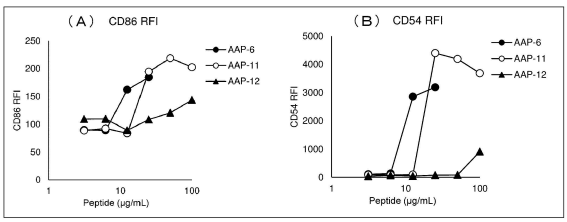
【図２】



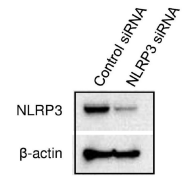
【図３】



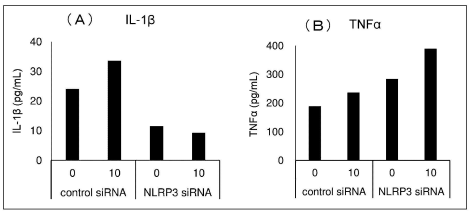
【図４】



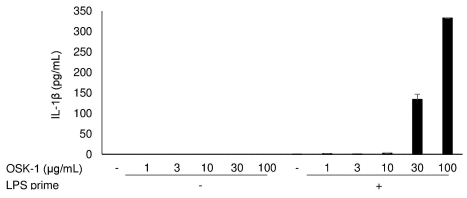
【図５】



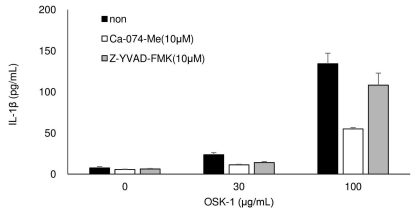
【図６】



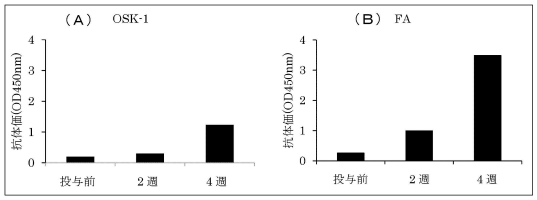
【図７】



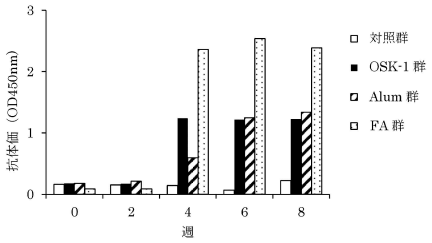
【図８】



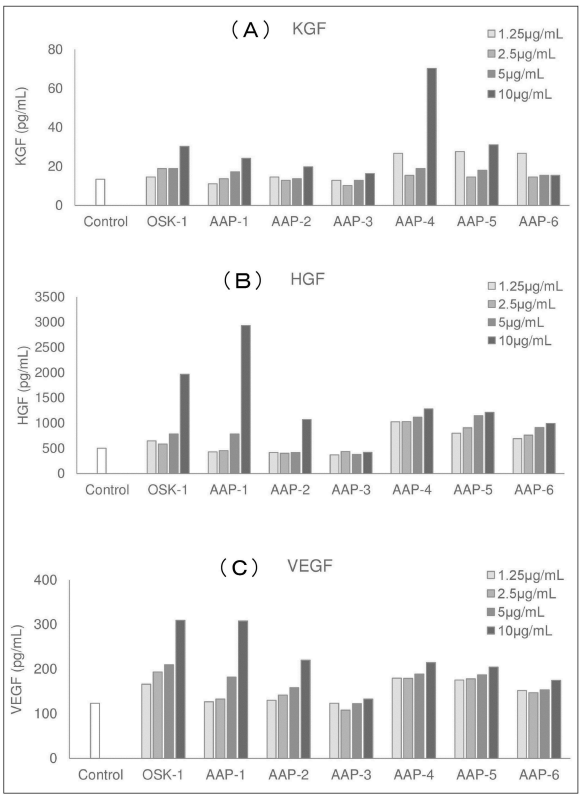
【図９】



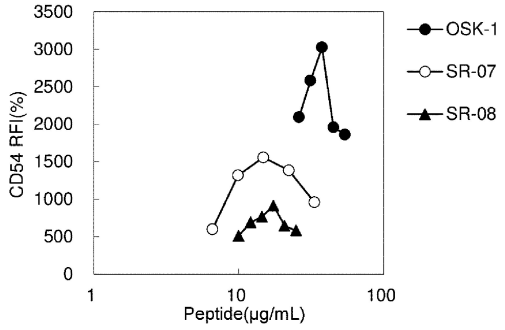
【図１０】



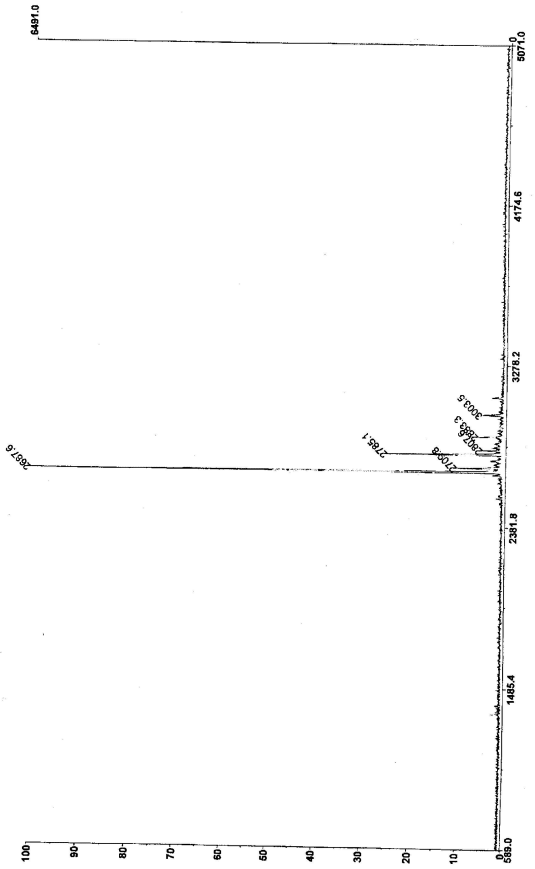
【図１１】



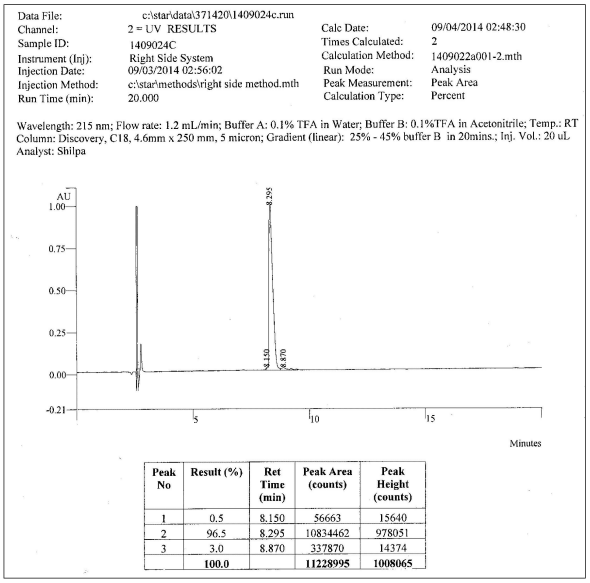
【図１２】



【図１３】



【図１４】

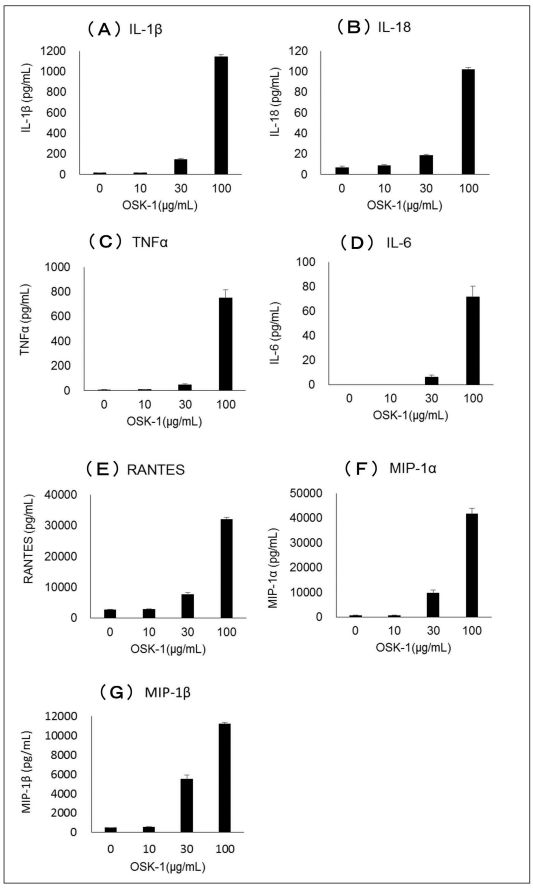


Data File:	c:\star\data\371420\1409024c.run
Channel:	2 = UV RESULTS
Sample ID:	1409024C
Instrument (Inj):	Right Side System
Injection Date:	09/03/2014 02:56:02
Injection Method:	c:\star\methods\right side method.mth
Run Time (min):	20.000
Calc Date:	09/04/2014 02:48:30
Times Calculated:	2
Calculation Method:	1409022a001-2.mth
Run Mode:	Analysis
Peak Measurement:	Peak Area
Calculation Type:	Percent

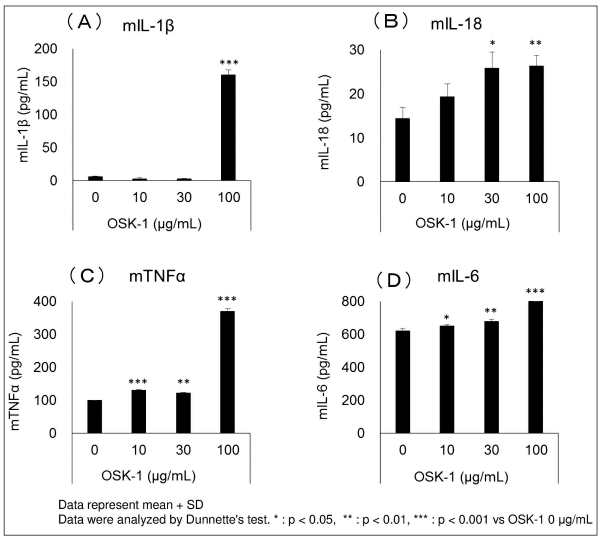
Wavelength: 215 nm; Flow rate: 1.2 mL/min; Buffer A: 0.1% TFA in Water; Buffer B: 0.1%TFA in Acetonitrile; Temp.: RT
Column: Discovery, C18, 4.6mm x 250 mm, 5 micron; Gradient (linear): 25% - 45% buffer B in 20mins.; Inj. Vol.: 20 uL
Analyst: Shilpa

Peak No	Result (%)	Ret Time (min)	Peak Area (counts)	Peak Height (counts)
1	0.5	8.150	56663	15640
2	96.5	8.295	10834462	978051
3	3.0	8.870	337870	14374
	100.0		**11228995**	**1008065**

【図１５】

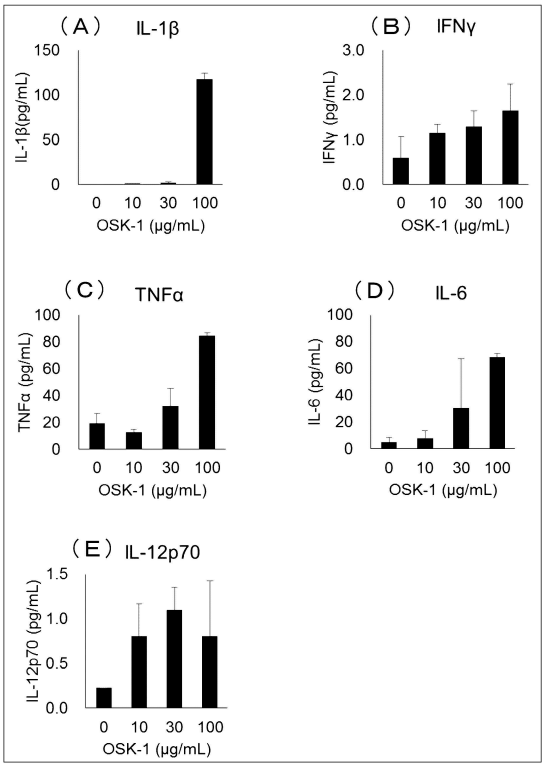


【図１６】

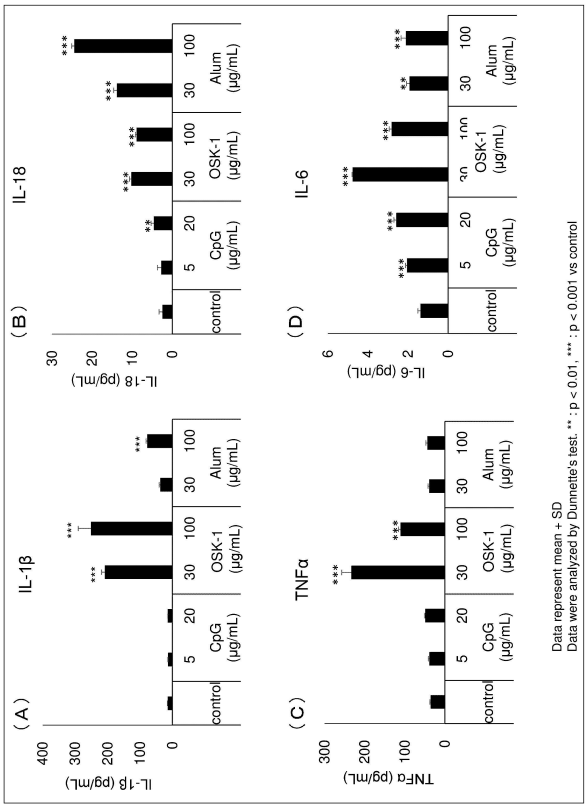


Data represent mean + SD
Data were analyzed by Dunnette's test. * : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001 vs OSK-1 0 μg/mL

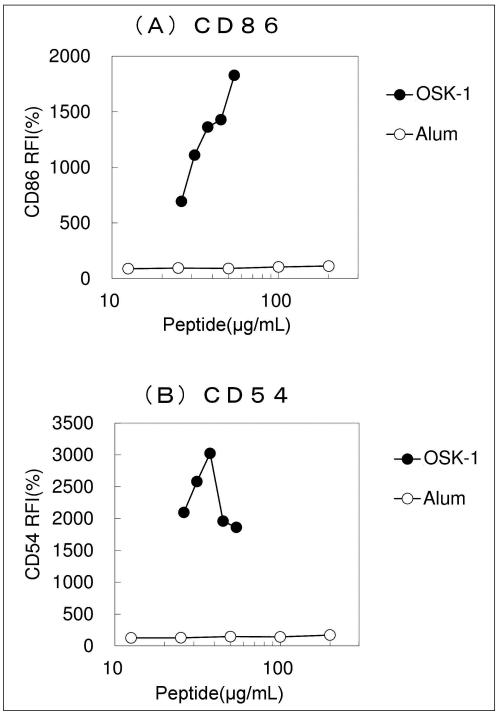
【図１７】



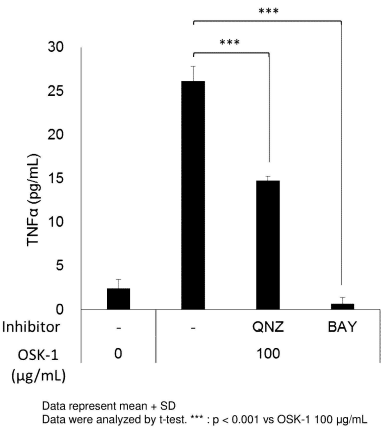
【図１８】



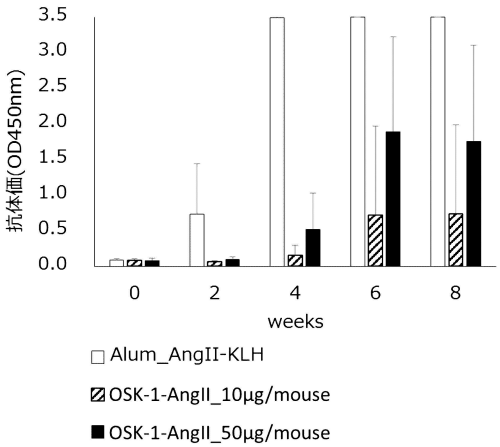
【図１９】



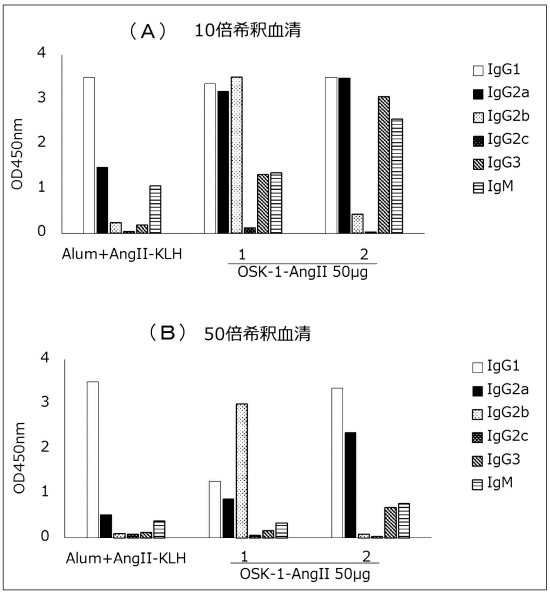
【図２０】



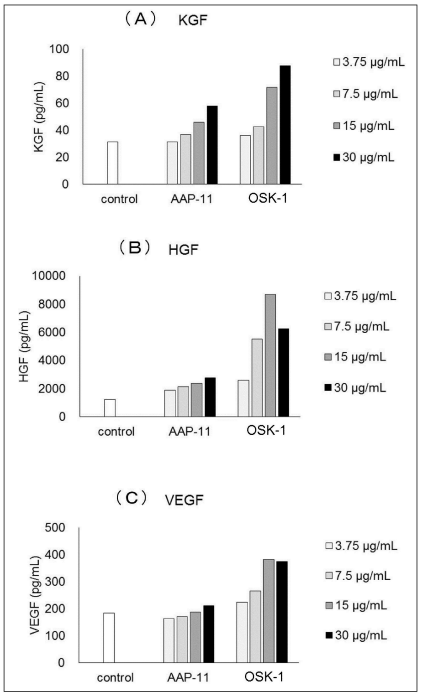
【図２１】



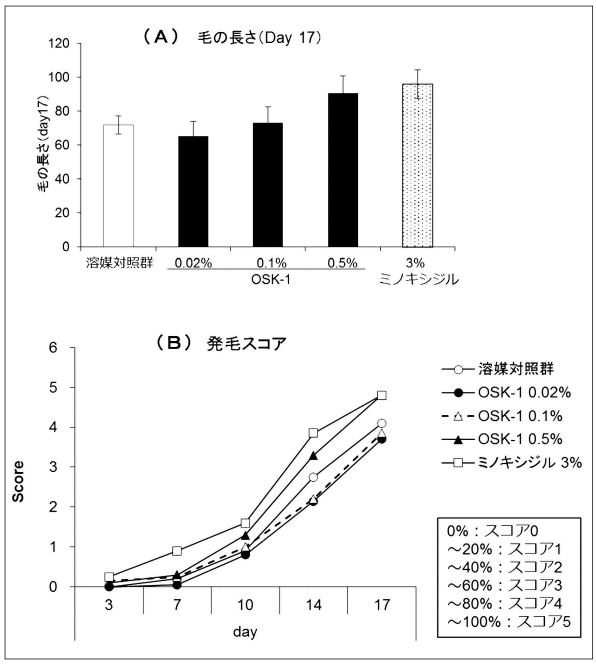
【図２２】


（A） 10倍希釈血清
OD450nm
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG2c
IgG3
IgM
Alum+AngII-KLH
1
2
OSK-1-AngII 50μg
（B） 50倍希釈血清
OD450nm
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG2c
IgG3
IgM
Alum+AngII-KLH
1
2
OSK-1-AngII 50μg

【図２３】


（A） KGF
KGF (pg/mL)
3.75 μg/mL
7.5 μg/mL
15 μg/mL
30 μg/mL
control
AAP-11
OSK-1
（B） HGF
HGF (pg/mL)
3.75 μg/mL
7.5 μg/mL
15 μg/mL
30 μg/mL
control
AAP-11
OSK-1
（C） VEGF
VEGF (pg/mL)
3.75 μg/mL
7.5 μg/mL
15 μg/mL
30 μg/mL
control
AAP-11
OSK-1

【図２４】


（A） 毛の長さ（Day 17）
毛の長さ(day17)
溶媒対照群
0.02%
0.1%
0.5%
3%
OSK-1
ミノキシジル
（B） 発毛スコア
Score
day
溶媒対照群
OSK-1 0.02%
OSK-1 0.1%
OSK-1 0.5%
ミノキシジル 3%
0%：スコア0
～20%：スコア1
～40%：スコア2
～60%：スコア3
～80%：スコア4
～100%：スコア5

【配列表】
0006721901000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61K 39/00	***(2006.01)***	A61K	39/00	H
A61P 17/14	***(2006.01)***	A61P	17/14	
A61K 38/10	***(2006.01)***	A61K	38/10	

(72)発明者　天満　昭子
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内

審査官　濱田　光浩

(56)参考文献　国際公開第２０１４／１５７４８５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／１３７５９４（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／６１９１５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　　７／０８
Ａ６１Ｋ　３８／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）