

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6367372号
(P6367372)

(45) 発行日 平成30年8月1日(2018.8.1)

(24) 登録日 平成30年7月13日(2018.7.13)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/14
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 K 35/51 (2015.01)	A 6 1 K 35/51
A 6 1 K 35/35 (2015.01)	A 6 1 K 35/35

請求項の数 12 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-569371 (P2016-569371)
(86) (22) 出願日	平成27年3月2日(2015.3.2)
(65) 公表番号	特表2017-524654 (P2017-524654A)
(43) 公表日	平成29年8月31日(2017.8.31)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/002007
(87) 国際公開番号	W02016/006788
(87) 国際公開日	平成28年1月14日(2016.1.14)
審査請求日	平成29年1月23日(2017.1.23)
(31) 優先権主張番号	62/021, 362
(32) 優先日	平成26年7月7日(2014.7.7)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	62/052, 635
(32) 優先日	平成26年9月19日(2014.9.19)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	516067139 メディポスト・カンパニー・リミテッド MEDIPOST CO., LTD. 大韓民国、13494 ギョンギド、ソ ンナムシ、ブンダング、デワンパンヨ ーロ 644ボンギル、21 21, Daewangpangyo-ro 644beon-gil, Bund ang-gu, Seongnam-si , Gyeonggi-do 13494 , Republic of Korea
(74) 代理人	110000877 龍華国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 育毛を刺激する小サイズの幹細胞の能力および当該幹細胞の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脱毛を予防し、育毛を刺激するための組成物であって、

8 μm または 8 μm 未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または前記小サイズの幹細胞の馴化培地を活性成分として備え、

前記組成物は、8 μm 超の直径を有する大サイズの幹細胞及び前記大サイズの幹細胞の馴化培地を含まない、

組成物。

【請求項 2】

8 μm または 8 μm 未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞は、骨髄由来、臍帯血由来、脂肪由来、血液由来、肝臓および腸由来、皮膚由来、消化管由来、胎盤由来、神経由来、副腎由来、表皮由来、および子宮由来のヒト成体幹細胞、並びに胚性幹細胞から成る群から選択される少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

8 μm または 8 μm 未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞は、骨髄、臍帯血または脂肪由来である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

8 μm または 8 μm 未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞は、前記臍帯血由来である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

10

20

8 μmまたは8 μm未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞は、臍帯血由来の間葉系幹細胞である、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記臍帯血はヒト由来である、請求項4に記載の組成物。

【請求項7】

前記馴化培地はケラチノサイト 無血清培地 (K S F M) を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

8 μmまたは8 μm未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞または前記幹細胞の前記馴化培地は、毛包幹細胞を活性化する、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項9】

8 μmまたは8 μm未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞または前記幹細胞の前記馴化培地は、

- (i) 毛周期における休止期から成長期への転換のための時間を低減する、
 - (ii) 毛周期制御を正常化する、および
 - (iii) 乳頭細胞の生成を増加させる、
- 機能を有する、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

前記組成物は、医薬組成物または化粧品組成物である、請求項1に記載の組成物。

【請求項11】

8 μm超の大サイズの幹細胞及び前記大サイズの幹細胞の馴化培地を使用しない、育毛を刺激し、脱毛を予防するための組成物の製造のための、8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または前記小サイズの幹細胞の馴化培地の使用。

20

【請求項12】

8 μmまたは8 μm未満の直径を有する前記小サイズの幹細胞は臍帯血由来である、請求項11に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

30

本願は、2014年7月7日に提出された米国特許出願第62/021,362号および2014年9月19日に提出された米国特許出願第62/052,635号に基づく優先権の利益を主張し、当該出願の開示は参照により本明細書にその全体が組み込まれる。本発明は小サイズの幹細胞、特に8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を予防し、育毛を刺激するための組成物、当該組成物を調製する方法並びに当該組成物の使用に関する。本発明は8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞の育毛刺激機能を利用する組成物の使用に関し、休止期における毛包幹細胞の活性を大きく高める。

【背景技術】

【0002】

40

産業の発達、環境汚染、ストレスおよび高齢化の進行に伴い、脱毛症または薄毛が徐々に進行しており、生活の質および外観への関心がウェルビーイング世代において高まりつつある。

【0003】

頭皮からの毛の損失である脱毛症は、例えば、遺伝子構成若しくは男性ホルモンの作用、日々の生活における精神的ストレス等の内部原因および頭皮の過酸化脂質の蓄積等の外部原因といった様々な原因により発生する。脱毛の症状は、非常に複雑なプロセスによって引き起こされることが知られている。

【0004】

禿頭症とは、毛が抜け落ちることによる毛の欠如を意味するのではなく、徐々に薄毛に

50

なり、毛がより細く、より柔らかくなることによる毛の欠如を意味し、禿頭症の進行に伴い、毛根内の真皮乳頭がより小さくなっていく。真皮乳頭がより小さくなるにつれ、毛はより細くなり、毛周期はより短くなり、新たに成長している毛はさらに細くなる。禿頭症が継続的に進行すると、毛はより柔らかくなり、毛周期はさらに短くなり、毛は少し成長し、その後抜け落ちる。また、円形脱毛症は自己免疫疾患により引き起こされることが知られており、内分泌障害、栄養不足、薬または出産等の物理的または精神的ストレスの後、一時的な脱毛が発生することも注目を集めている。

【0005】

最近、男性型脱毛および肥満女性の脱毛を含む脱毛が、より若い世代に徐々に広がりつつある。2009年に国民健康保険公団の保健福祉政策のための韓国機関(Korean Institute for Health and Welfare Policy of National Health Insurance Corporation)により発行された参考資料によると、2008年に国内の脱毛患者数は2001年のそれと比べ60%以上増加し、子供および若者の脱毛患者数は2006年から2011年の5年間にわたり、21,643から23,025へと約6.4%増加した。

10

【0006】

このような脱毛を改善するために、様々な種類の育毛ソリューションが市販されている。現在、Economy 21の調査によると、韓国のヘアケアサービス市場規模は80%が化粧品およびサニタリー補助用品で、20%が医薬であり、このうち、病院に来る脱毛患者数は5%のみである。現在、ヘアケア製品のユーザのうち、不満を持つユーザは72.7%である。しかしながら、米国食品医薬品局(FDA)により承認された薬は、およそ15年前の1998年に発売されたミノキシジルおよびフィナステリドといった2つしかないので、脱毛症の様々な原因は、2つの薬のみでは完全には克服できない。特に、フィナステリド(登録商標)から作られたプロペシア(登録商標)は、抗脱毛製剤であるが、育毛ソリューションではない。プロペシア(登録商標)は、DHTの生成を阻害する5 α -レダクターゼをブロックし、男性型脱毛を可能な限り長く遅延させる。

20

【0007】

市場における育毛ソリューション(例えば、ミノキシジル(登録商標)およびフィナステリド(登録商標))は、ホルモン薬の適用により引き起こされる副作用を有し、毛根が活性化されている部分においてのみ効果的であるので、それらは脱毛の予防に効果的ではあるが、長期間の休止期における育毛にはわずかな効果しかなく、また継続的に摂取または塗布する必要がある。従って、脱毛症または薄毛に対する経済的で安定した技術の開発が必要である。韓国では、先進諸国と比較して、脱毛症のための薬の研究開発が技術的に不十分であり、脱毛の予防に関する研究開発、育毛の刺激、および毛の再生は非常に緊急性のある課題である。一方、脱毛に関する研究として、毛の再生および毛根に関する文献は、1950年以来報告されているが、再現性がないことにより、毛の再生は、過去50年間不可能であると考えられてきた。

30

【0008】

しかしながら、1990年に、毛包幹細胞が初めて発見され(1990年、Cell)、ヒト由来の毛包幹細胞が初めて単離され(2006年、J. Clin. Invest)、実現不可能であった毛包の再生可能性の結果がペンシルベニア大学医学部のCostarelis教授によって報告(2007年、Nature)され、その結果、禿頭症の根本的な治療の研究の可能性が開かれた。

40

【0009】

最近、遺伝子を使用する脱毛症の治療方法および幹細胞を使用する脱毛症の治療方法が開発中である。本発明の背景技術として、韓国特許第10-0771171号(2007年10月29日)には、毛包幹細胞を単離および増殖し、当該幹細胞を毛包細胞に分化させる方法並びに脱毛を治療するための組成物が開示されている。韓国特許公開公報第10-2008-0097593号(2008年11月6日)には、脂肪由来の幹細胞と毛包細胞とを好適に混合することによって製造される細胞治療生成物が開示されている。また

50

、韓国特許第10 1218101号(2013年1月3日)には、活性成分として羊水内の胎児の間葉系幹細胞の馴化培地を含有する育毛を刺激するまたは脱毛を予防するための組成物が開示されている。

【0010】

しかしながら、小サイズの幹細胞による明白な有効性という観点から優れた効果を示す、育毛を刺激するまたは脱毛を予防するための組成物は報告されていない。

【0011】

よって、発明者らは間葉系幹細胞が培養される場合、一般的に様々なサイズの細胞が採取されることを確認した。また発明者らは細胞のサイズによる効果の可能性に基づき、様々な組織に由来する間葉系幹細胞のサイズによる毛包幹細胞の活性化により引き起こされる育毛刺激能力を比較することによって、特定サイズまたは当該特定サイズ未満の直径を有する幹細胞が育毛を刺激する非常に優れた効果を示すことを見出し、その結果、本発明は完成された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】韓国特許第10-0771171号(2007年10月29日)

【特許文献2】韓国特許第10-1422559号(2014年7月17日)

【特許文献3】韓国特許公開公報第10-2013-0009117号(2013年1月23日)

【特許文献4】韓国特許公開公報第10-2014-0125735(2014年10月29日)

【特許文献5】韓国特許公開公報第10-2008-0097593号(2008年11月6日)

【特許文献6】韓国特許第10-1218101号(2013年1月3日)

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Yoo、YK Seo、JK Parkその他によるEffect of Mesenchymal Cells on Human Hair Growth and Death. Korean J. Chem. Eng., 25(2), 295(2008)

【非特許文献2】VA Botchkarev、J KishimotoによるMolecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. J. Invest Dermatol. Symp. Proc., 8(1), 46(2003)

【非特許文献3】D Fiszler、M Kurpisz、T SiminiakによるStem cell therapy as the reinforcement of organ regeneration. Artif. Organs., 29(5), 366(2005)

【非特許文献4】H Oshima、A Rochat、C Kedziaその他、Y BarrandonによるMorphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell, 104(2), 233(2001)

【非特許文献5】KS Stenn、G CotzarelisによるBioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology. Curr Opin. Biotechnol., 16(5), 493(2005)

【非特許文献6】S Tiede、JE Kloeppe、E Bodoその他によるHair follicle stem cells: Walking the maz

10

20

30

40

50

e. Eur. J. Cell Biol., 86 (7), 355 (2007)

【非特許文献7】K Kataoka, R J Medina, T Kageyama 他による Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. Am. J. Pathol., 163 (4), 1227 (2003)

【非特許文献8】C Blanpain, WE Lowry, A Geoghegan 他による Self-renewal, multipotency and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. Cell, 118 (5), 635 (2004)

10

【非特許文献9】M J Hoogduijn, E Gorjup, P G Genever による Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev., 15 (1), 49 (2006)

【0014】

本明細書中、様々な論文および特許文献が参照され、それらの引用が記載されている。引用される論文および特許文献の中で開示される内容は、参照により本明細書にそれら全体が組み込まれる結果、本発明が属する技術分野のレベルおよび本発明の内容がより明確に説明されることになる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は、毛包幹細胞の活性を刺激する、非常に優れた育毛刺激機能を有するあるサイズの幹細胞を使用するものである。本発明は 8 μ m 若しくは 8 μ m 未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を予防し、育毛を刺激するための組成物を提供することを対象とする。

【0016】

本発明はまた当該組成物を使用した脱毛を予防し、育毛を刺激する方法を提供することも対象とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0017】

当該目的を解決するため、本発明は育毛を刺激する、小サイズの直径を有する幹細胞の機能および当該幹細胞の様々な使用を提供する。

【0018】

本発明の一例示的な実施形態として、8 μ m 若しくは 8 μ m 未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を予防し、育毛を刺激するための組成物が提供される。

【0019】

8 μ m 若しくは 8 μ m 未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地は、毛包幹細胞を活性化する機能を有し、より具体的には (i) 毛周期における休止期を成長期に転換する時間を低減する、(ii) 毛周期制御を正常化する、および (iii) 乳頭細胞の生成を増加する効果を有するので、脱毛を予防し、育毛を刺激する効果が得られる。

40

【0020】

本明細書では、8 μ m または 8 μ m 未満の直径を有する小サイズの幹細胞は、骨髄由来、臍帯血由来、脂肪由来、血液由来、肝臓および腸由来、皮膚由来、消化管由来、胎盤由来、神経由来、副腎由来、表皮由来、および子宮由来のヒト成体幹細胞並びに胚性幹細胞から成る群から選択される少なくとも 1 種類の幹細胞であってよく、好ましくは、骨髄由来、臍帯血由来または脂肪由来であり、より好ましくは臍帯血由来の成体幹細胞であり、最

50

も好ましくは臍帯血由来の間葉系幹細胞である、さらにヒト由来の臍帯血が最も好ましく使用される。

【0021】

また、馴化培地は、基礎培地として動物細胞の培養に好適な任意の培地であってよく、非限定的な一例として、最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)またはケラチノサイト無血清培地(KSFM)が使用されてよい。好ましくは、MEM培地が使用される。

【0022】

組成物は、医薬組成物または化粧品組成物の形態で調製されることによって提供されてよい。

10

【0023】

一方、本発明の別の例示的な実施形態において、8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を防止し、育毛を刺激するための組成物を使用する方法が提供される。

【0024】

本発明の別の例示的な実施形態において、8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として使用する脱毛の治療方法も提供される。

【0025】

それらの方法において、幹細胞または当該幹細胞の組成物は、注射を使用する経皮投与により投与されることが最も好ましい。ここではシリンジ針の穴を上向きに置くことにより、組成物が対象の真皮に投与される方法によって注射は有効に行われる。

20

【0026】

よって、本発明は様々なサイズの幹細胞が混在する従来の不均一の細胞と比較して、8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または当該幹細胞の馴化培地は脱毛を予防し、育毛を刺激する効果について最も優れた能力を有することを見出すことに基づいて完成された。本発明は毛包幹細胞の活性化により、脱毛を予防し、育毛を刺激する、8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞による優れた効果および当該幹細胞の様々な使用を提供する。

【0027】

本発明の複数の例示的な実施形態が、添付図面を参照して以下に詳細に記載される。本発明は、本発明に係る例示的な実施形態に関し図示および記載されるが、当業者には本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な修正がなされ得ることは自明であろう。

30

【0028】

本明細書で使用される用語について以下定義する。

【0029】

「育毛の刺激」または「脱毛の予防」とは、類似の意味を有し、当該技術分野において使用される、発毛の刺激若しくは育毛の促進および毛の弱体化若しくは脱毛の予防といった別の用語も含む。

40

【0030】

「幹細胞」とは、あらゆる組織に発達可能な細胞を意味する。反復分裂により、自己を作成する自己複製、および環境により特定の機能を有する細胞に分化する多性能という2つの基本的な特性がある。

【0031】

「間葉系幹細胞」とは、ヒトまたは哺乳類の組織から単離された未分化の成体幹細胞の一種であり、様々な組織に由来してよい。成体幹細胞の中でも、造血幹細胞は通常非接着性であるが、間葉系幹細胞は通常接着性である。特に、間葉系幹細胞は臍帯由来の間葉系幹細胞、臍帯血由来の間葉系幹細胞、骨髄由来の間葉系幹細胞、脂肪由来の間葉系幹細胞、筋肉由来の間葉系幹細胞、神経由来の間葉系幹細胞、皮膚由来の間葉系幹細胞、羊膜由

50

来の間葉系幹細胞、または胎盤由来の間葉系幹細胞であってよく、好ましくは臍帯血由来の間葉系幹細胞であってよい。各組織から幹細胞を単離する技術は当該技術分野において既知である。

【0032】

「幹細胞の馴化培地」とは、幹細胞を培養することによって得られる、培地に含まれる成分を含有する材料であり、馴化培地を調製するために、任意の種類 of 幹細胞が限定なく使用されてよい。例えば、馴化培地を調製するための幹細胞は、胚性幹細胞、または成体幹細胞であってよい。さらに、成体幹細胞はあらゆる組織に由来してよい。本発明の一例示的な実施形態において、馴化培地は臍帯血由来の成体幹細胞を使用して調製される。

【0033】

「分化」とは、分裂時、増殖時、および成長時に細胞の構造または機能を特殊化する現象を意味し、すなわち、独自の役割を行うための生物の細胞または組織の形態または機能における変化である。一般に、それは比較的単純な系を少なくとも2つの質的に異なる部分的な系に分裂する現象である。

【0034】

細胞の「増殖」または「培養」という用語は、分裂による同種の細胞の増幅、すなわち、一般に多細胞生物における細胞の数の増加を指す。増殖（増幅）により、細胞の数が一定のレベルに到達すると、一般に特性が変化（分化）し、同時に制御される。

【0035】

「培地」とは、生物から取り出した細胞を培養および増殖させるための混合物を意味し、例えば糖類、アミノ酸、様々な種類の栄養素、血清、成長因子およびミネラル等の細胞の培養および増殖に使用される必須要素を含有する。特に、本発明の培地は、幹細胞の培養および増殖のための培地である。

【0036】

「基礎培地」とは、必須の糖類、アミノ酸、水等、細胞の生存に要求されるものを含有する混合物であり、栄養物質および様々な種類の成長因子を除いた混合物である。本発明の基礎培地として、人為的に合成された培地または市販の調製済み培地を使用してよい。市販の調製済み培地としては限定はされないが例えばダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、内皮分化培地（EDM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F10、F12、最小必須培地（MEM）、グラスゴー最小必須培地（GMEM）、またはイスコブ改変ダルベッコ培地であってよい。

【0037】

「治療」とは、有益なまたは例示的な臨床結果を得るためのアプローチを意味する。本発明の目的として、有益なまたは例示的な結果とは、症状の緩和、病気範囲の低減、病状の安定化（すなわち、悪化しない）、病気の進行の遅延または病気の進行速度の低減、病状の改善または一時的緩和および低減（部分的または全体的）を無制限に含み、それらは検出可能なものまたは検出不可能なものを含む。「治療」は、すべての治療療法、および防止的または予防的方法を意味する。治療とは、障害の予防および既発の障害のために要求される治療を含む。病気の「緩和」/「緩和している」とは、病状の範囲および/または非典型的な臨床症状が低減され、並びに/または病気の進行の時間的経過が遅延または延長されることを意味する。

【0038】

「有効量」とは、有益な若しくは例示的な臨床的または生化学的な結果に影響を及ぼす好適な量である。有効量は、一回またはそれより多く投与されてよい。有効量とは、病気の進行を一時的に緩和、改善、安定化、回復、または遅延させるために好適な量である。本発明において有効量とは、脱毛の進行を低減若しくは遅延させるため、または育毛を刺激するために好適な量である。特定の動物が組成物の投与に持ちこたえる場合、または組成物が当該動物への投与に適切である場合、それは組成物が「医薬的または生理学的に利用可能」であることを意味する。投与されることになる組成物の量が生理学的に重要である場合、調製が「治療上の有効量」で管理されていると言える。調製があることにより、

10

20

30

40

50

特定の患者に生理学的に検出可能な変化をもたらされる場合、当該調製は生理学的に有意である。

【0039】

用語「約」とは、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%分変動する参考量、レベル、値、数、頻度、パーセント、寸法、サイズ、分量、重量または長さを示す。

【0040】

本明細書中、文脈が別途の要求をしていない限り、「含む(include)」および/または「含み(including)」並びに「備える(comprise)」および/または「備え(comprising)」は、段階若しくは要素または段階若しくは要素から成る群の存在を指定するが、1または複数の他の段階若しくは要素、または当該段階若しくは要素から成る群の存在または追加を除外しないことを理解されたい。

10

【0041】

以下に、本発明について詳細に記載する。

【0042】

[幹細胞]

【0043】

本発明は、脱毛を予防し、育毛を刺激するための小サイズの直径を有する幹細胞の使用に関する。

【0044】

20

幹細胞とは、自己複製能力および少なくとも2つの細胞に分化する能力を有する細胞である。発生源に応じ、胚性幹細胞または成体幹細胞が使用されてよく、本発明においては、好ましくは、様々なソース(source)から生ずる様々な組織由来の成体幹細胞が使用されてよく、例えば脂肪、子宮、骨髄、筋肉、胎盤、臍帯血または表皮等の組織に由来する幹細胞が使用されてよい。より具体的には、幹細胞は間葉系幹細胞(MSC)である。間葉系幹細胞は一般に造血を助ける間質であり、骨、軟骨、脂肪および筋肉の細胞を含む、様々な中胚葉細胞に分化する能力を有し、未分化状態を維持しつつ容易に増殖する。本発明の例示的な一実施形態において、脂肪由来、骨髄由来および臍帯血由来の間葉系幹細胞(MSC)が使用される。

【0045】

30

最も好ましくは、臍帯血由来の間葉系幹細胞が使用される。

【0046】

臍帯血とは、出産後に臍帯から生成される血液であり、白血球および赤血球並びに血小板を形成する造血幹細胞および内皮前駆細胞を大量に含む。また、臍帯血は軟骨および骨、筋肉、および神経を形成する間葉系幹細胞も含んでおり、故に医療分野において非常に貴重である。臍帯血は、骨髄または末梢血の造血幹細胞より造血幹細胞の濃度が高く、成熟度が低い。従って、骨髄に存在する造血幹細胞と比較して、臍帯血内の造血幹細胞はより優れた増殖能力、自己複製能力および分化能力を示す。また、臍帯血は簡易な医療手順によって、破棄された臍帯から取得可能であり、臍帯は所定量よりはるかに多くの造血幹細胞および幹細胞を含むので、本発明の一態様において、ヒト臍帯血から単離された間葉系幹細胞が使用される。

40

【0047】

特に、臍帯血由来の間葉系幹細胞は、(i)細胞療法製品に使用される場合、他の組織由来の幹細胞とは異なり、多くの場合免疫拒絶反応を回避できる、(ii)一般的に破棄される胎盤および臍帯から取得可能であるので、幹細胞が生成される際、ドナーは何ら苦痛を有さない、(iii)適用時に、病変に直接投与可能である。ここで、幹細胞が該当する病変に実際に移植されると、パラクリン作用が活性化されて、病変を治療、再生または回復させることのできるセクレトーム因子(蛋白質、サイトカイン)が分泌され、その結果、病変が治癒される。一方で、本発明による幹細胞は当該技術分野において既知の方法によって増殖および培養されてよい。

50

【 0 0 4 8 】

好適な培地としては、動物細胞、特に哺乳類の細胞を培養するために作成された任意のものであってよく、または動物細胞の培養に要求される、例えば同化可能な炭素、窒素および/または微量栄養素等の好適な成分を用いてインビトロで調製可能な任意のものでよい。

【 0 0 4 9 】

培地は、動物細胞の培養のために好適な任意の基礎培地であってよく、非限定的な一例として、最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI)、またはケラチノサイト 無血清培地 (K SFM) が、細胞の培養のために使用される基礎培地として一般的に使用されてよい。これ以外にも当該技術分野において使用される任意の培地が限定なく使用されてよい。好ましくは、培地は、MEM培地 (GIBCO)、K SFM培地、DMEM培地 (W el g e n e)、MCD B 131培地 (W el g e n e)、IMEM培地 (GIBCO)、DMEM/F12培地、PCM培地、M199/F12 (mixture) (GIBCO)、およびMSC expansion培地 (Chemicon) から成る群から選択されてよい。

10

【 0 0 5 0 】

炭素、窒素、微量栄養素の同化可能なソース、および非限定的な一例としての血清源、成長因子、アミノ酸、抗生剤、ビタミン、レダクターゼ、および/または糖類源がそのような基礎培地に添加されてよい。しかしながら、様々な組織由来の幹細胞に最も好適な複数の培地が選択可能または組み合わせ可能であり、幹細胞は当業者によって好適に培養可能であることは自明である。例示的な一実施形態において、MEM培地またはK SFM培地が使用される。

20

【 0 0 5 1 】

幹細胞は当業者によって、当該技術分野における従来知識に基づいて、好適な培養環境、時間、温度といった諸条件を制御することによって培養可能であることも自明である。

【 0 0 5 2 】

例示的な一実施形態において、間葉系幹細胞は約80から90%、好ましくは約90%の細胞コンフルエンスを有するよう、MEM培地で培養および増殖され、例えばPBSを用いて洗浄され、その後、約20~25時間、好ましくは24時間、K SFM培地でさらに培養された。

30

【 0 0 5 3 】

用語「コンフルエンス (%)」とは、面積当たりの細胞密度 (飽和度) を表すために当該技術分野で従来使用されており、細胞培養における単位面積当たりの細胞の数 (細胞密度) を相対的に表すために当業者によって実験で通常使用される単位である。本発明はまた、8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞および当該幹細胞の馴化培地を調製する方法を含む。

【 0 0 5 4 】

一方で、方法はさらに、本発明により培地で培養された幹細胞をトリプシンで処理する工程を含む。培養された幹細胞がトリプシンで処理される場合、単一細胞タイプの幹細胞が得られてよく、ここでトリプシンは、細胞間の凝集を阻害し、単一細胞タイプの幹細胞を有するように処理される。トリプシンは、細胞間の凝集の形成を阻害可能な材料で置き換えられてよい。

40

【 0 0 5 5 】

幹細胞の培養は、従来既知のコンテナで行われてよい。例えば、幹細胞は3次元パイオリアクタまたはスピナーを使用して、または一般的な接着コンテナの中で培養されてよい。

【 0 0 5 6 】

[育毛を刺激する機能]

【 0 0 5 7 】

50

本発明は、10 μmまたは10 μm未満、最も好ましくは8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞の脱毛を予防および育毛を刺激するための特に優れた機能の使用に関する。

【0058】

8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞の脱毛を予防および育毛を刺激するための機能は、毛周期の正常化によって引き起こされ、毛包幹細胞の活性を刺激することによって毛包の数および厚みを増やし、毛周期における休止期から成長期への転換のための時間を低減し、乳頭細胞の生成を増やす。

【0059】

人間の毛は、成長期、退行期および休止期のサイクルが繰り返されるプロセスを経て、毛の抜け落ちおよび再生が行われ、毛周期はホルモンまたは様々な成長因子を制御することによって操作される。毛は皮膚の中に埋設され、表皮および真皮によって覆われており、毛包と呼ばれる。毛包には毛を制御する組織である真皮乳頭が存在し、毛母細胞が真皮乳頭のすぐ上に毛を形成し、分裂しながら新しい毛を生成し、毛を上向きに押し出す。真皮乳頭細胞は、細胞の成長が活性化されている成長期、退化が開始する退行期、および休止期から成るサイクルを有する。休止期後に隣接する細胞からシグナルを受信すると、その細胞は成長期に再び入り、細胞の再生が行われ、その結果、新しい毛が生成される。

【0060】

毛包は哺乳類のみの皮膚器官であり、表皮と間葉との間の相互作用によって出生前段階から生成される。

【0061】

出生前段階における毛包の生成は、真皮からのシグナルに応答して開始し、それにより表皮は厚くなり、プレート状に形成される。厚い表皮プレートから発生する表皮シグナルは、間葉由来の皮膚細胞の凝集を誘起し、真皮シグナルが再度、形成された凝集体から発生する。このシグナルは表皮細胞の増殖を刺激し、表皮細胞の真皮への入り込みを誘起して凝集物を囲む結果、真皮乳頭が形成される。従って、第1の毛包構造が形成され、次に表皮細胞の増殖および分化が発生し、毛を生成する成熟した毛包の発達へと導く。成熟した毛包内で、毛包の基底膜を通して、毛母細胞と真皮乳頭細胞との間の相互作用によって、毛母細胞の専門分化が起こる結果、毛が生成され、成長する。また、当該相互作用によって、毛包のサイクルがもたらされ、器官が維持され、毛の厚みおよび形態等の生物学的特性を決定する。

【0062】

毛包内の生物学的特性を制御する2つの重要な要因は、毛包表皮である外毛根鞘(ORS)細胞および間葉由来の皮膚乳頭(DP)であり、毛は毛周期の繰り返しを通して成長し、抜け落ちる。

【0063】

角質層および毛は、それぞれ皮膚表面および毛包の増殖および分化を通して生成され、抜け落ち、それらを継続的に補い、維持し、再生する基礎細胞源が幹細胞である。毛包は膨張部分に表皮幹細胞のコンテナを有しており、当該コンテナは毛包の維持並びに皮脂腺および毛幹表皮の再生に関与することが知られている。また、毛包の下の真皮鞘(DS)の中には、成長期の毛包の真皮乳頭を維持するための間葉由来のTA細胞があり、間葉由来のTA細胞は、生合成皮膚の真皮の成分、すなわち線維芽細胞を交換可能な細胞源として知られており、研究対象となっている。従って、脱毛は、本発明の休止期における毛包幹細胞を活性化する方法によって効果的に治療可能であることが理解できる。

【0064】

特に、本発明の8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞は、毛周期における休止期から成長期への転換のための時間を大幅に低減する。すなわち、毛周期の制御は休止期の毛包幹細胞の活性を刺激することによって正常化される。

【0065】

以下に、本発明の8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞の脱毛を予

10

20

30

40

50

防し、育毛を刺激するための機能に関する特性について記載する。

【0066】

(i) 本発明の8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞は、乳頭細胞の生成に参与する幹細胞および毛の長さを伸ばすことに参与する幹細胞を活性化する。

【0067】

育毛を可能にする従来のソースは、育毛を誘発するために必要な様々な要因のうちの一部のみに影響することが報告されている。例えば、既知の先行技術文献では、育毛に参与する毛包幹細胞の活性化とは、真皮乳頭(DP)の生成に参与する幹細胞または毛の長さを伸ばすことに参与する幹細胞の活性化である。

【0068】

対照的に、本発明によると、当該2種類の幹細胞に加え、毛髪に関連する毛包幹細胞の多くが活性化されるので、毛包の数および厚みが増え、組織の厚みも増える。すなわち、本発明は様々な要因に同時に影響を及ぼすソースを提供し、それは脱毛および育毛の刺激のための組み合わせられた治療に使用される。

【0069】

(ii) 本発明の8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞は、毛周期における休止期から成長期へと転換するための時間を大きく低減する。

【0070】

従って、本発明の8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞は、ホルモンに対する一時的な効果ではなく、毛周期制御を正常化することにより、永久的な育毛効果を示す。

【0071】

ミノキシジル(登録商標)を含む従来の薬は、永久的な治療なしに、脱毛の進行を遅延させ、または成長期にある現在の毛の維持を助ける。故に薬の使用が停止されると、直ちに脱毛が発生する。

【0072】

しかしながら、本発明の小サイズの幹細胞は、毛周期の正常化により、毛包の数および厚みが増加し、真皮乳頭(DP)の生成が増加するので、永久的な育毛効果に基づき、脱毛を根本的に治療可能である。

【0073】

本発明の例示的な一実施形態において、小サイズの臍帯血由来の間葉系幹細胞は、成長期への転換のための最短時間を有することが確認されている。さらに、育毛のための薬として広く知られるミノキシジル(登録商標)およびPRPと比較して、小サイズの臍帯血由来の間葉系幹細胞は、毛包の数および厚みをさらに大幅に増加させ、すなわち、育毛への最も高い効果を示す。

【0074】

また、様々なサイズの幹細胞が混在する従来の不均一の幹細胞と比較して、本発明の8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地は、毛包幹細胞を活性化させることにより育毛を刺激する高い効果を示すことが確認されている。

【0075】

従来知られているように、間葉系幹細胞が培養されるとき、様々なサイズ分布を有する幹細胞が混在される。しかしながら、本発明においては、本発明の8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの細胞のみが培養のために抽出される場合、育毛を刺激する効果が大きく示される。

【0076】

すなわち、脱毛を予防し、育毛を刺激する効果については、幹細胞の「サイズ」が非常に重要な要因であり、8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞は、脂肪、骨髄または臍帯血等の幹細胞が由来する組織の種類に関わらず、メラニンを低減する優れた効果を有しており、特に、8 μmまたは8 μm未満の直径を有する小サイズの臍帯血

10

20

30

40

50

由来の幹細胞が最も優れた効果を有する。

【0077】

[組成物および当該組成物の使用]

【0078】

従って、一態様において、本発明は8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する育毛を刺激するための組成物、当該組成物を調製する方法、当該組成物を使用する脱毛を防止し、育毛を刺激する方法を提供する。

【0079】

幹細胞は、10～30% (v/v)、好ましくは15～25% (v/v)、最も好ましくは20% (v/v)の細胞毒性を示さない範囲の有効濃度において含有されてよいが、本発明はその点において限定されない。

10

【0080】

本発明の一例示的な実施形態として、本発明の組成物は、医薬組成物および/または化粧品組成物を含む。

【0081】

[医薬組成物]

【0082】

別の態様において、本発明は8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を予防し、または育毛を刺激するための医薬組成物を提供する。

20

【0083】

脱毛または脱毛症は大きくは瘢痕性脱毛症および非瘢痕性脱毛症に分類され、非瘢痕性脱毛症は先天性脱毛症、男性型脱毛症および円形脱毛症を含み、本発明においては、すべての種類のもが含まれるが、本発明はこの点において限定されない。

【0084】

本発明の医薬組成物内に含まれる医薬的に利用可能なキャリアは、調製において従来使用されるキャリアであり、当該キャリアとしては限定はされないが、ラクトース、ブドウ糖、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、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、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよびミネラル油が含まれる。本発明の医薬組成物は上記の成分に加え、さらに潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁液、または防腐剤を含んでよい。

30

【0085】

本発明の医薬組成物の好適な投与量は、調製方法、投与方法、患者の年齢、体重、性別、病気の重症度、食事、投与時間、投与経路、排せつ率および反応感度等の諸要因により異なり、当業者は所望の治療に対する有効量を容易に判断してよく、医薬組成物の有効量を処方してよい。一方、本発明の医薬組成物の投与量は、限定はされないが、一日当たり0.01～2000 mg/kg (体重)であってよい。

40

【0086】

本発明の医薬組成物は経口または非経口で投与されてよく、非経口投与の場合、医薬組成物は静脈注射、皮下注射、筋肉注射、腹部注射、または経皮投与によって投与されてよく、非経口投与が好ましい。本発明の医薬組成物の投与経路は、医薬組成物が適用される病気の種類により判断されてよい。

【0087】

例えば、本発明の医薬組成物は皮膚への局所塗布による投与が最も好ましい。本発明の組成物の適用可能な領域は、頭皮に加え、育毛を必要とする身体の任意の領域であってよい。例えば、医薬組成物は、怪我により生じた傷痕に起因して毛が損傷された領域、または広い額若しくはM字額、単なる美容効果のためにまつげ若しくは眉に使用されてよく、

50

無毛の症状を改善する。

【0088】

最も好ましくは、本発明の組成物は注射による経皮投与によって投与される。

【0089】

ここで、皮膚内の真皮への十分な拡散の後、毛細血管を通して組成物を流すために、すなわち、十分拡散することなく真皮をすぐに通過し、身体に直ちに流入することを防ぐために、組成物はシリンジ針の穴を上向きに置き注入されてよい。

【0090】

[化粧品組成物]

【0091】

さらなる別の態様において、本発明は8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を予防し、または育毛を刺激するための化粧品組成物を提供する。

【0092】

本発明の化粧品組成物は、当該技術分野において従来的に調製される、例えばエマルジョン、クリーム、フェースローション、パック、ファンデーション、ローション、流体または頭髮用化粧品といった任意の製品形態で調製されてよいが、本発明はこの点において限定されない。

【0093】

当該組成物はシャンプー、ヘアリンス、ヘアトリック、ヘアジェル、ヘアローション、ヘアパック、ヘアスプレー、ヘアムース、ヘアトリートメント、ヘアカラー、ヘアコンディショナー、それらの混合物、例えばシャンプーおよびリンスの混合物、リンスおよびトリートメントの混合物といった種類で調製されてよい。または従来の添加物を添加することにより育毛を刺激するリキッドタイプの育毛ソリューション、およびエアロゾルタイプの組成物も含まれてよい。

【0094】

本発明の化粧品組成物の製品形態がペースト、クリームまたはゲルの場合、キャリア成分として、動物油、植物油、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、シリカ、タルクまたは酸化亜鉛が使用されてよい。本発明の化粧品組成物の形態がパウダーまたはスプレーの場合、キャリア成分として、ラクトース、タルク、シリカ、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムまたはポリアミド粉末が使用されてよく、特に、本発明の化粧品組成物の形態がスプレーの場合、クロロフルオロ炭化水素、プロパン/ブタンまたはジメチルエーテル等の推進剤が追加的に含まれてよい。本発明の化粧品組成物の形態がソリューションまたはエマルジョンの場合、キャリア成分として、例えば、水、エタノール、イソプロパノール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチルグリコールオイル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコールまたはソルビタン脂肪酸エステル等の溶媒、可溶化剤または乳化剤が使用されてよい。本発明の化粧品組成物の形態が懸濁液の場合、キャリア成分として、水、エタノールまたはプロピレングリコール等の液相の希釈剤、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールエステル、またはポリオキシエチレンソルビタンエステル、微結晶性セルロース、水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天またはトラガカント等の懸濁液が使用されてよい。本発明の化粧品組成物の形態が界面活性剤を含有するクレンザーの場合、キャリア成分として、脂肪族アルコール硫酸塩、脂肪族アルコールエーテル硫酸塩、スルホコハク酸モノエステル、イセチオン、イミダゾリウム誘導体、メチルタウリン、サルコシネート、脂肪酸アミドエーテル硫酸塩、アルキルアミドベタイン、脂肪族アルコール、脂肪酸グリセリド、脂肪酸ジエタノールアミド、植物油、ラノリン誘導体またはエトキシ化グリセロール脂肪酸エステルが使用されてよい。

【0095】

本発明の化粧品組成物に含有される成分は化粧品組成物に従来的に使用される成分が含

10

20

30

40

50

まれてよく、それらは活性成分に加え、例えば抗酸化剤、スタビライザー、可溶化剤、ビタミン、顔料および香料、並びにキャリアを含む従来のアジュバントである。

【0096】

化粧品組成物は従来使用される任意の方法により調製されてよい。

【0097】

脱毛を予防し、育毛を刺激するための化粧品組成物は直接的な塗布または頭皮若しくは毛への注射等の経皮投与によって使用されてよい。

【0098】

本発明の組成物に含有される活性成分である混合抽出物の適用量は、40 mg / kg または40 mg / kg 未満、好ましくは成人を基準に20 ~ 40 mg / kg であってよい。

10

【0099】

当該技術分野において既知の組成物を皮膚に適用するすべての方法が使用されてよい。本発明の化粧品組成物は、一回または繰り返しの塗布によって使用されてよく、または塗布のみ若しくは別の化粧品組成物と組み合わせ使用されてよい。また、本発明による優れた皮膚保護効果を有する化粧品組成物は、従来の方法により使用されてよく、使用回数は皮膚の状態またはユーザの好みにより変更されてよい。

【0100】

さらに異なる観点から、本発明は8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または当該幹細胞の馴化培地を活性成分として使用して脱毛を治療する方法にも関する。

20

【0101】

上記方法において、使用される幹細胞または当該幹細胞の組成物は、前述したものと同一である。

【0102】

脱毛を治療する方法において、特に幹細胞または当該幹細胞の組成物は、注射を使用する経皮投与を介して投与されることが好ましい。ここで、皮膚の真皮への十分な拡散の後、毛細血管を通して組成物を流すために、すなわち、十分拡散することなく真皮をすぐに通過し、身体に直ちに流入することを防ぐために、組成物はシリンジ針の穴を上向きに置き注入されてよい。

【0103】

30

上記のとおり、本発明による8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞、または当該幹細胞の馴化培地は医薬組成物および化粧品組成物に基づいて記載されたが、本発明は8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該組成物の馴化培地を活性成分として含有する、脱毛を予防し、育毛を刺激する効果を有する様々な種類の組成物および当該組成物を使用する方法を含むことが当業者には自明である。

【0104】

すなわち、本発明による8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該組成物の馴化培地は、毛包幹細胞の活性を刺激し、毛周期における休止期から成長期への転換のための時間を短縮し、乳頭細胞の生成を増やし、結果的に脱毛を予防し、育毛を刺激する非常に優れた効果を有し、本発明はまたそのような効果に基づく様々な使用を含む。

40

【0105】

[有利な効果]

【0106】

本発明によると、8 μm若しくは8 μm未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地が、毛包幹細胞の活性を刺激し、毛周期における休止期から成長期への転換のための時間を低減し、乳頭細胞の生成を増加させ、それにより、非常に優れた脱毛予防および育毛刺激効果を示すので、適用可能な分野において非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0107】

50

本発明の例示的な実施形態について添付図面を参照して詳細に記載することで、本発明の上記目的および他の目的、特徴、並びに利点が当業者にとってより明らかになるであろう。

【図1】毛包を観測するためにマウスの組織が取得される際、毛包の長さまたは数を効果的に観測するための切断片を製造する方法を示す概略図である。

【図2】肉眼で観測される、コントロールおよびhUCB MSCの複数のグループのC3Hマウスの育毛効果を示すイメージである。

【図3】コントロールおよびhUCB MSCの複数のグループのC3Hマウスの皮膚組織における毛包の数および長さ並びに皮膚厚みの比較を示す顕微鏡イメージである。

【図4】コントロール、および脂肪由来の間葉系幹細胞、骨髄由来の間葉系幹細胞、臍帯血由来の間葉系幹細胞から単離した小サイズの細胞のC3Hマウスにおける育毛効果を比較するイメージであり、第5週から第7週にかけて肉眼で観測されたものである。

【図5】コントロール、および脂肪由来の間葉系幹細胞、骨髄由来の間葉系幹細胞、臍帯血由来の間葉系幹細胞から単離した小サイズの細胞のC3Hマウスにおける育毛効果（第7週での）についての動物組織学的解析の結果の組み合わせを示すイメージである。

【図6】コントロール、および脂肪由来の間葉系幹細胞、骨髄由来の間葉系幹細胞、臍帯血由来の間葉系幹細胞から単離した小サイズの細胞の馴化培地のC3Hマウスにおける育毛効果（第8週での）についての動物組織学的解析の結果の組み合わせを示すイメージである。

【図7】時間経過によるHaCaT細胞増殖に対する小サイズのhUCB-MSCの効果を確認するためのCCK-8実験結果を示すグラフである。

【図8】生/死染色によるコントロール、脂肪由来の間葉系幹細胞、骨髄由来の間葉系幹細胞、臍帯血由来の間葉系幹細胞における真皮乳頭(DP)細胞の増殖効果を示すイメージである。

【発明を実施するための形態】

【0108】

[本発明を実施するためのベストモード]

【0109】

以下に、実施例を参照しつつ本発明についてさらに詳細に記載する。実施例は本発明を説明するために提供されているにすぎず、当業者にとっては、本発明の範囲は実施例に限定されると解釈されないことは自明である。

【0110】

発明者らは、有毛細胞の成長への効果を観測し、育毛を刺激する効果を確認すべく、様々な組織に由来する様々なサイズの幹細胞を単離した。小サイズの幹細胞は細胞の老化を遅延させること、細胞は年を取るにつれ、細胞のサイズが大きくなり、増殖速度が低くなるという事実に基づく。

【0111】

[材料および方法]

1. 幹細胞の調製

(1) 幹細胞の単離

【0112】

本発明においては、メディポスト社(韓国)から提供されたヒト臍帯血由来の間葉系幹細胞が使用された。幹細胞は臍帯血を取得し、臍帯血から間葉系幹細胞を単離し、幹細胞を培養することにより取得可能である。工程についての詳細な説明は以下の通りである。

【0113】

臍帯血を取得する工程では、正常の経膣分娩において、出産後胎盤がまだ子宮内に残っている間に、抽出された臍静脈から臍帯血が取得される。または帝王切開においても、出産後胎盤が子宮から抽出される間にも臍帯血は臍静脈から取得される。

【0114】

本発明において、臍帯血が出産後の子宮から抽出される臍静脈から取得される場合、出

10

20

30

40

50

産後無菌操作法により、胎盤と胎児を繋ぐ臍静脈から取得されてよい。まず、臍静脈が取得された後、臍帯血が収集針を使用して抗凝固剤が入った臍帯血ポーチに入れられる。

【0115】

取得された臍帯血からの間葉系幹細胞を単離および培養する方法は、従来使用される任意の方法であってよく、それらには韓国特許第10-0494265号(Pittinger MF、Mackay AMその他によるScience、284:1437,1999; Lazarus HM、Haynesworth SEその他によるBone Marrow Transplant、16:55764,1995)内に開示される方法が含まれる。

【0116】

取得された臍帯血から遠心分離により単球が単離され、数回洗浄されてデブリが除去され、培養コンテナに好適な密度で播種され、培養された。細胞が単層に増殖した後、位相差顕微鏡を使用してコロニーの形態に増殖された均一の紡錘状細胞が間葉系幹細胞として識別された。また、細胞がコンフルエントになるまで培養されたとき、細胞は二次培養により必要な細胞数に増殖された。

【0117】

一方、コントロールとして使用された様々な細胞は、HEK293細胞、脂肪細胞(ATCC、米国)、骨髄(ロンザ、米国)、hDPC、およびHaCat(中央大学により提供)であった。

【0118】

(2) 馴化培地の調製

【0119】

馴化培地はhUCB MSC、BM MSC、および脂肪 MSCから調製された。貯蔵状態(LN2タンクに貯蔵された)にある細胞は解凍され、5%CO₂を含有するインキュベータ内で37℃で培養され、MEM(GIBCO)培地内で約90%の細胞コンフルエンスを有するように増殖された。

【0120】

その後、細胞はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて3回洗浄され、フェノールレッドが添加されていないケラチノサイト無血清培地(KSFM)内で24時間インキュベーションされ、馴化培地を得た。上記手順が3日間繰り返された。また、得られた馴化培地はろ過(トップフィルタシステム、Nunc)された後、冷蔵庫に貯蔵され、凍結された。

【0121】

2. 共培養

【0122】

hUCB MSC(5000、10,000、15,000、20,000細胞数/上部チャンバ)がトランスウェルチャンバ(ファルコン、米国)内の毛関連細胞、DPおよびHaCatと共に上部チャンバ(ポアサイズ:1μm)で共培養された。

【0123】

3. 小サイズの細胞の単離

【0124】

貯蔵状態(LN2タンクに貯蔵された)にある細胞は解凍され、5%CO₂のインキュベータ内で37℃で培養され、小サイズの幹細胞が、8および20μmのメンブレンフィルタを使用して単離、取得された。

【0125】

ここで、8~20μmの直径を有する細胞が20μmのメンブレンフィルタを使用した後、8μmのメンブレンフィルタを使用して取得された。

【0126】

また、幹細胞はそれらをグループ1、グループ2、グループ3を含む3つのグループに分割することによってテストされた。グループ1は単離前に様々なサイズの幹細胞が混在

10

20

30

40

50

していたヘテロな幹細胞から成り、グループ2は8 μmまたは8 μm未満の直径を有する幹細胞から成り、グループ3は20 μmまたは20 μm超の直径を有する幹細胞から成る。

【0127】

4. 育毛を観測するためのC3Hマウスの準備

【0128】

実験場所として、メディポスト社（IRB承認番号：131021-1）および京畿道バイオセンター（IACUCプロジェクト番号：IACUC2014-4-10）が使用された。C3HマウスはSaeronbio社から購入され、ジャクソン研究所で用意された。

10

【0129】

特に、本発明の実験で使用されたC3Hマウス（ジャクソン研究所、日本）は、育毛有効性モデルとして使用されたマウスモデルであり、毛が除去されると休止期が開始され、他の種類とは異なり、成長期に転換するのに非常に長期間かかる。すなわち、他の種類のマウスとは異なり、C3Hマウスは、非常に長期の休止期のために、休止期を誘発させる薬を扱わなくても、育毛効果を確認できる優れた動物モデルである（Journal of Investigative Dermatology（2005）124, 288-289）。

【0130】

C3Hマウスの皮膚の表面は、毛が成長している成長期では黒くなり、退行期ではピンクになるので、育毛時はマウスの皮膚の色を観測することによって検出できる。

20

【0131】

発明者らは、生後7週のC3Hマウスを取得し、マウスは1週間の順化を通して環境に順応された。また、発明者らは、臍帯血由来の間葉系幹細胞をマウスモデルに注入することによって、毛周期の休止期から成長期への転換時を観測する意図であった。この例では、PBSが注入されたマウスモデルがネガティブコントロールとして使用された。

【0132】

一方、毛を剃るため、マウスは麻酔された。5mlのゾレチル（バーコード#3UHC、韓国）に3.36mlのロンブン（バイエルコリア、2094L、韓国）を混合し、7.47mlの生理食塩水（JW Pharmaceutical、REG# 10055、韓国）を添加することによって、15.83mlの溶液が麻酔薬として調製され、マウスは20 μlの当該溶液を用いて麻酔された。

30

【0133】

また、麻酔後、マウスはヘアトリマーを使用して毛を剃られた。マウスはクリーンペーパーの上に置かれ、まず毛は育毛方向とは逆方向に剃られた。マウスは24時間維持された後、残りの毛を除去すべく再チェックされた。

【0134】

5. 本発明の幹細胞の注入

【0135】

本発明の幹細胞が皮膚内の真皮を通してマウスの体内に直接流入するのを防止すべく、シリンジ針の穴が上向きになるよう置かれ、麻酔されたマウスの真皮に入れられ、十分な拡散なく真皮をすぐに通過して、体内に直ちに流入することを防止した。ここで、臍帯血由来の間葉系幹細胞が注入されるとき、幹細胞が外部に漏れないよう皮膚はしっかりとまかれ、皮膚をこすりながら針を皮膚から抜くことによって幹細胞が完全に注入された。

40

【0136】

6. マウスの組織の取得

【0137】

本発明による効果をチェックするために、臍帯血由来の間葉系幹細胞が注入されたマウスから皮膚組織が取得された。

【0138】

50

6 ウェルプレート、鉗子、手術用はさみ、クリーンペーパーおよびヘアリムーバーが準備され、まずマウスの既に成長済みの毛が除去された。頭部に最も近い背中の皮膚が鉗子を使用して選定され、手術用はさみを使用して皮膚組織が切開され、切り取られた組織がペーパー上に貼り付けられ、六角形の形状に再度切開された。ここで、写真撮影されることになる組織の部分を損傷しないよう切開は注意深く行われ、互いに容易に付着し合うよう、ペーパーを組織の端部にぴったり合わせつつ行われた。

【0139】

図1は、毛包の長さおよび厚みを観測するための切断片を作成する方向(上)および毛包の数およびサイズを観測するための切断片を作成する方向(下)を示す概略図である。これらの方向に組織が取得されると、毛包の長さ方向の断面および数に関する断面が観測可能である。

10

【0140】

7. H & E 染色

【0141】

取得された組織は - 80 で貯蔵され、観測のためにPBSを用いて15分間洗浄され、4%スクロースを含有するPBSを用いて15分間、再度3回洗浄された。その後、結果物は30%スクロースを含有するPBSと4で一晩反応させた。翌日、結果物は30%スクロースが溶解された水性洗浄物を用いて15分間再度3回洗浄され、皮膚組織は厚み10 μmで切開された。

【0142】

20

調製された組織は25で30秒間、ハリスヘマトキシリンで染色され、水で10分間洗浄された。また、得られた組織は25で1分間、エオシンで染色され、25で10秒間、95%アルコールを用いて2回洗浄された。その後、組織は100%アルコールを用いて10秒間、2回洗浄され、25で2分間、キシレンと反応させ、顕微鏡(ニコン、ECLIPS E600W、日本)を使用して観測された。毛包の形態はH & E染色により観測可能であり、育毛サイクルが確認された。

【0143】

8. 免疫組織化学

【0144】

試料は、25で15分間、4%パラホルムアルデヒド(PFA、シグマ、米国)との反応によって固定された。免疫抗体が容易に試料内に浸透するように、15分後、試料は冷PBSを用いて洗浄され、PBSを使用して0.3%トリトンX 100(シグマ、米国)が添加され、25で10分間試料と反応させた。

30

【0145】

次に、試料は5分間、三回洗浄され、25で1時間、1%BSAを含有するPBSでブロックされた。その後、ウサギKi 67(1:250、アブカム、英国ケンブリッジ)およびマウスPCNA(1:250、アブカム、英国ケンブリッジ)の一次抗体を当該試料と4で一晩反応させた。また、ウサギCy3(1:400、ジャクソン研究所、米国カリフォルニア州)およびマウスAlexa488(1:400、ジャクソン研究所、米国カリフォルニア州)の二次抗体が追加され、25で1時間30分、追加の反応が行われた。

40

【0146】

その後、二次抗体が破棄され、光にさらされないよう、暗所でPBSを用いて3回洗浄された。試料の核が1 μg/mlのDAPI(1:1000;シグマアルドリッチ、米国ミズーリ州セントルイス)を用いて25で5分間染色され、観測のため、蛍光顕微鏡(ニコン)および共焦点顕微鏡(ツァイス、LSM700/ドイツ、ニコンエクリプス TE2000 U/日本)の各々に載せられた。

【0147】

9. CCK8解析

【0148】

50

細胞増殖を検出するために、400 μ lの培地およびセルカウティングキット（CCK 8、ドージンドウ、米国）の40 μ lの試薬が、5%CO₂下、37℃で1時間処理され、培地は96ウェルプレートに移されて、450 nmでの光学密度（OD）を、分光光度計を用いて検知した。

【0149】

10. 生/死染色を使用する定量解析

【0150】

生/死染色は、2色の蛍光プローブを使用して生細胞および死細胞を染色する方法である。死細胞はエチジウムホモダイマー（EthD）により565～605 nmのチャネル波長において赤で示され、生細胞はカルセインにより440～480 nmのチャネル波長において緑で示される。

10

【0151】

馴化培地の上清が除去され、ペレットがPBSを用いて1回または2回洗浄された後、2 mMのLive/Dead Viability/Cytotoxicityキット（インビトロゲン）の試薬、20 μ lのEthD 1および5 μ lの4 mMカルセインAMが、10 mlのPBSに混合された混合剤を用いて、室温で30分間染色された。

【0152】

染色が使用され、Incucyte（商標）FLR（エッセンバイオサイエンス社、米国、ツアイス、LSM 510 META）蛍光イメージにより生細胞または死細胞が観測された。

20

【0153】

実施例1：ヒト臍帯血由来の間葉系幹細胞（hUCB MSC）の育毛に対する効果

1.1 肉眼による育毛の観測

【0154】

休止期がC3Hマウスで誘起され、PBSがネガティブコントロールとしてマウスの背中の半分に注入された。hUCB MSC 3グループおよびHEK293細胞グループがそれぞれ 1×10^6 細胞/100 μ lおよび 5×10^5 細胞/100 μ lで、マウスの背中のもう半分の1か所に1回、試験グループとして注入された。

【0155】

その後、マウスの育毛が5週間にわたり観測され、結果は図2に示されている。

30

【0156】

図2からわかる通り、hUCB MSCグループにおいてのみ、C3Hマウスは毛周期を休止期から成長期へと転換することにより、育毛を示した。ここにおいて、 1×10^6 細胞で注入された場合と比較して、細胞が 5×10^5 細胞で注入された、グループ2の8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有する幹細胞の場合に、毛がより長く、より広範囲に成長した。すなわち、8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有するhUCB MSCが 5×10^5 細胞/100 μ lで注入された場合に、最も優れた育毛効果が示された。

【0157】

1.2 毛包の観測

【0158】

次に、発明者らはhUCB MSCの育毛に対する効果およびC3Hマウスの組織状態における育毛に關与する毛包の観測を試みた。

40

【0159】

この目的のため、上記方法により組織切断片が作成され、毛包の数および長さ並びに皮膚組織の厚みを観測するためにH&E染色により染色された。

【0160】

結果、図3に示される通り、本発明によりhUCB MSCが注入されたグループにおいて、かなり多数の毛包が観測された。毛包の長さは長く、皮膚組織の厚みは2倍以上厚かった。ここで、8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有するhUCB MSCが 5×10^5 細胞注入された場合に、最も多い数および最も長い毛包並びに最も厚い皮膚厚みが得られ

50

た。

【 0 1 6 1 】

1 3 馴化培地の育毛効果の観測

【 0 1 6 2 】

上記方法（調製例 1 （ 2 ））により調製された馴化培地が上記方法によってマウスに投与され、8 週間後にマウスの育毛が観測された。結果は図 6 に示されている。

【 0 1 6 3 】

h U C B M S C のマウスおよび毛包イメージを示す図 6 からわかる通り、特に、2 0 μ m または 2 0 μ m 超の直径を有する h U C B M S C の馴化培地と比較し、8 μ m または 8 μ m 未満の直径を有する h U C B M S C の馴化培地が投与された場合に、優れた育毛効果が示された。また、毛包イメージから毛包の数および長さにおいてかなりの違いが存在したこともわかる。この結果によると、8 μ m または 8 μ m 未満の直径を有する幹細胞および当該幹細胞の馴化培地は、最も優れた育毛効果を有したことが確認できる。

10

【 0 1 6 4 】

実施例 2 様々な元の組織による幹細胞の育毛効果

2 1 肉眼による育毛の観測

【 0 1 6 5 】

発明者らは、脂肪由来の間葉系幹細胞（脂肪 M S C、A D M S C）、骨髄由来の間葉系幹細胞（骨髄 M S C、B M M S C）および臍帯血由来の間葉系幹細胞（h U C B M S C）の育毛効果を比較して、幹細胞の元の組織の育毛に対する影響を調べた。

20

【 0 1 6 6 】

この目的のために、C 3 H マウスに休止期が誘起された後、A D M S C、B M M S C および h U C B M S C が一か所に一回 5×10^5 細胞の量で注入され、育毛が 5 週目、6 週目、および 7 週目で観測された。

【 0 1 6 7 】

結果は図 4 に示されている。

【 0 1 6 8 】

図 4 に示される通り、h U C B M S C が注入された C 3 H マウスが最も優れた育毛効果を有した。まず第 5 週で育毛現象が観測され、少なくとも第 7 週で、U C B M S C が注入されたグループで、マウスの全部位の 9 0 % 以上において毛が成長する現象が観測された。

30

【 0 1 6 9 】

また、ポジティブコントロールとして使用されるミノキシジル（登録商標）グループおよび P R P グループと比較して、h U C B M S C が注入された場合に、はるかに高い育毛効果が観測された。

【 0 1 7 0 】

2 2 毛包の観測

【 0 1 7 1 】

また、追加の細胞移植後の第 8 週において、C 3 H マウスの皮膚組織内の毛包が観測された。

40

【 0 1 7 2 】

図 5 に示される通り、H & E 染色による毛包の数および長さ並びに皮膚組織の厚みの解析の結果、A D M S C および B M M S C と比較して、h U C B M S C が使用された場合に、最も多い数および最も長い毛包が観測され、皮膚組織の厚みは 2 倍以上厚かった。

【 0 1 7 3 】

2 3 他の組織由来の幹細胞の馴化培地

【 0 1 7 4 】

上記方法（調製例 1 （ 2 ））により調製された馴化培地が、上記方法と同一方法によってマウスに投与され、第 8 週目において育毛が観測された。結果は図 6 に示されている

50

。

【0175】

図6のイメージからわかる通り、AD MSC 馴化培地およびBM MSC 馴化培地と比較し、hUCB MSC 馴化培地が使用された場合に、最も多い数および最も長い毛包が観測され、皮膚組織の厚みはより厚かった。

【0176】

実施例3 真皮乳頭細胞の生成の観測

【0177】

育毛は真皮乳頭(DP)部分の細胞増殖と深い関連があることは既に知られている。この事実に基づいて、発明者らはPCNA抗体およびKi67抗体を使用して、DP部分の細胞増殖を確認する意図であった。

10

【0178】

結果、図5に示される通り、様々なソースに由来する成体幹細胞の中でも、hUCB MSCが注入された場合に、DP部分で大きな細胞増殖効果が観測された。

【0179】

また、図6に示される通り、様々なソースに由来する成体幹細胞の馴化培地の中でも、hUCB MSCが注入された場合に、DP部分で大きな細胞増殖効果が観測された。

【0180】

上記結果により、様々な組織に由来する間葉系幹細胞の中でも、臍帯血由来の間葉系幹細胞および当該幹細胞の馴化培地が、最も高い育毛効果を示すソースである。

20

【0181】

比較例1 小サイズのhUCB-MSCの育毛効果

(1)インビトロ実験

【0182】

サイズによる幹細胞の育毛効果を比較するために、8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有する小サイズのhUCB MSC、20 μ mまたは20 μ m超の直径を有する大サイズのhUCB MSC、様々なサイズの細胞が混在したヘテロな細胞が解析に使用された。AD MSCおよびBM MSCが不均一な細胞状態で調製された。ミノキシジル(登録商標)およびPRPがポジティブコントロールとして使用され、HEK293細胞および未処理の培地がネガティブコントロールとして使用された。

30

【0183】

また、DP細胞およびHaCaT細胞の増殖に対する効果を観測するために、上記細胞は共培養システムを使用してインビトロで、上部チャンバで処理された。上記細胞は合計96時間観測のため処理され、CCK8での細胞増殖は24時間ごとの細胞数計測によって検出された。結果は図7および図8に示されている。

【0184】

DPおよびHaCaT細胞の増殖レベルは72時間の時点で最も高く、hUCB MSCはヘテロな細胞よりも2倍以上の細胞増殖を示したことが確認された。

【0185】

また、hUCB MSCのサイズによる増殖の差異の点においては、8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有する小サイズのhUCB MSCでは、DP細胞の増殖はコントロールグループ(図7)のそれより4.8倍以上であった。

40

【0186】

また、共培養システムの上部チャンバで播種された幹細胞は500細胞から200,000細胞の様々な数で培養され、幹細胞数が15,000であった場合に、最も高い細胞増殖が示された(図8)。

【0187】

また、生/死染色により、8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有する小サイズのhUCB MSCが最も高いDP細胞増殖効果(図8)を有したことが確認された。

【0188】

50

(2) インビボ実験

【0189】

細胞サイズにより育毛が観測された上記インビトロ結果と同様、細胞をC3Hマウスに注入することにより、インビボで育毛効果を確認することによって得られた結果が図5および図6に示されている。

【0190】

H&E染色により得られた結果により、8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有する小サイズのhUCB MSCおよびその馴化培地は、毛包の数および長さ並びに皮膚厚みにおいて優れた効果を示した。PCNAおよびKi67の蛍光染色を使用して調べた比較により同一の結果が得られた。

10

【0191】

このような結果によると、8 μ mまたは8 μ m未満の小さな直径を有する幹細胞、特に8 μ mまたは8 μ m未満の直径を有する小サイズの臍帯血由来の幹細胞および当該幹細胞の馴化培地は、DP細胞増殖および毛包の成長、結果として育毛を刺激し、それにより脱毛の予防および育毛の刺激において最も優れた機能を示し、従来例で示されるサイズ別に単離されず、不均一の幹細胞が単に培養された場合と比較し、特に傑出した効果を示した。

【0192】

また、20 μ mまたは20 μ m超の直径を有する大サイズの細胞および当該細胞の馴化培地が使用された場合、育毛の刺激に対し、有意な効果はなく、故に幹細胞に係る脱毛の予防および育毛の刺激は、幹細胞のサイズによって大きく影響されることがわかった。

20

【0193】

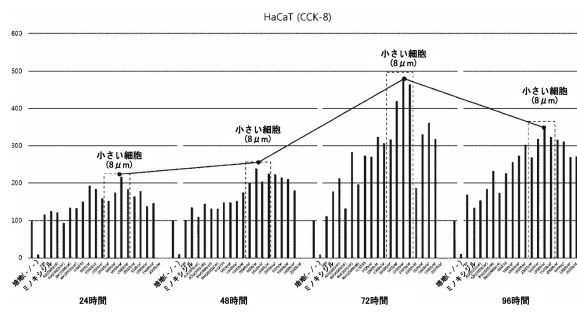
本発明によると、8 μ m若しくは8 μ m未満の直径を有する小サイズの幹細胞または当該幹細胞の馴化培地が、毛包幹細胞の活性を刺激し、毛周期における休止期から成長期への転換のための時間を低減し、乳頭細胞の生成を増加させ、それにより、非常に優れた脱毛予防および育毛刺激効果を示すので、適用可能な分野において非常に有用である。

【0194】

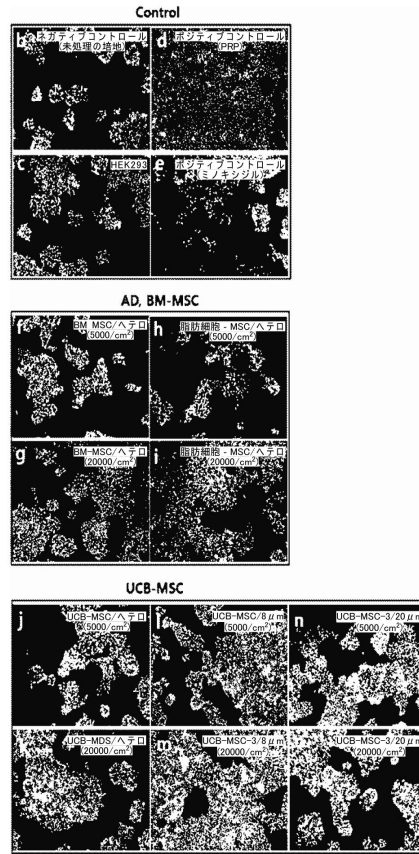
本発明の精神または範囲から逸脱することなく、本発明の複数の例示的な実施形態に対し様々な変形がなされ得ることは当業者に自明であろう。故に、そのような変形が添付の特許請求の範囲およびその均等内容の範囲に属する場合、本発明はそのようなすべての変形に及ぶ意図である。

30

【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/14	(2015.01)	A 6 1 K 35/14	Z
A 6 1 K 35/407	(2015.01)	A 6 1 K 35/407	
A 6 1 K 35/38	(2015.01)	A 6 1 K 35/38	
A 6 1 K 35/36	(2015.01)	A 6 1 K 35/36	
A 6 1 K 35/37	(2015.01)	A 6 1 K 35/37	
A 6 1 K 35/30	(2015.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K 35/12	(2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/50	(2015.01)	A 6 1 K 35/50	
A 6 1 K 35/48	(2015.01)	A 6 1 K 35/48	
A 6 1 K 8/98	(2006.01)	A 6 1 K 8/98	
A 6 1 Q 7/00	(2006.01)	A 6 1 Q 7/00	

- (72)発明者 ヤン、ユーン サン
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 オ、ウォン イル
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 リ、ジャン ヨウン
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 チョイ、スー ジン
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 ジェオン、ホン パエ
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 キム、ジュ イエオン
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 リム、フーン
大韓民国、13494 ギョンギ - ド ソンナム - シ、ブンダン - グ、ダエワンパンギョ - ロ、(サンピョンードン) 21 メディポスト カンパニー リミテッド内

審査官 佐々木 大輔

- (56)参考文献 特表2013-540150(JP, A)
特表2010-534072(JP, A)
国際公開第2013/081436(WO, A1)
国際公開第2014/089268(WO, A1)
形成外科, 2012, Vol.55, No.10, pp.1083-1089
Plast. Reconstr. Surg., 2013, Vol.132, No.5, pp.1159-1171

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 35 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580(JDreamIII)
CPlus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS(STN)