

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7202610号
(P7202610)

(45)発行日 令和5年1月12日(2023.1.12)

(24)登録日 令和4年12月28日(2022.12.28)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 36/03 (2006.01)

A 6 1 K

36/03

Z N A

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 0 5

A 6 1 P 17/14 (2006.01)

A 6 1 P

17/14

C 1 2 N 5/074(2010.01)

C 1 2 N

5/074

A 6 1 K 8/9711(2017.01)

A 6 1 K

8/9711

請求項の数 5 (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-233252(P2018-233252)

(22)出願日 平成30年12月13日(2018.12.13)

(65)公開番号 特開2020-94003(P2020-94003A)

(43)公開日 令和2年6月18日(2020.6.18)

審査請求日 令和3年10月18日(2021.10.18)

(73)特許権者 592262543

日本メナード化粧品株式会社

愛知県名古屋市中区鳥見町2丁目130

番地

(74)代理人 110002572

弁理士法人平木国際特許事務所

(72)発明者 宮地 克真

愛知県名古屋市中区鳥見町2-7 日本

メナード化粧品株式会社 総合研究所内

(72)発明者 山田 貴亮

愛知県名古屋市中区鳥見町2-7 日本

メナード化粧品株式会社 総合研究所内

(72)発明者 堀場 大生

愛知県名古屋市中区鳥見町2-7 日本

メナード化粧品株式会社 総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 幹細胞の未分化状態維持剤及び増殖促進剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

マコンブの抽出物を有効成分として含有する毛包幹細胞の未分化状態維持剤。

【請求項2】

マコンブの抽出物を有効成分として含有する毛包幹細胞の増殖促進剤。

【請求項3】

毛包幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、毛包幹細胞の製造方法。

【請求項4】

毛包幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、毛包幹細胞の未分化状態維持方法。

【請求項5】

毛包幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、毛包幹細胞の増殖促進方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、幹細胞の未分化状態維持剤及び増殖促進剤、並びに幹細胞の未分化状態維持方法及び増殖促進方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脊椎動物（特に哺乳動物）の組織は、傷害若しくは疾患、又は加齢等に伴い細胞・臓器の損傷が起こった場合、再生系が働き、細胞・臓器の損傷を回復しようとする。この作用に、当該組織に備わる幹細胞（組織幹細胞、体性幹細胞、成体幹細胞）が大きな役割を果たしている。幹細胞は、あらゆる細胞・臓器に分化する多能性を有しており、この性質により細胞・臓器の損傷部を補うことで回復に導くと考えられている。このような幹細胞を応用した、次世代の医療である再生医療に期待が集まっている。

【0003】

哺乳動物における幹細胞研究で最も進んでいる組織は骨髄である。骨髄には生体の造血幹細胞が存在しており、全ての血液細胞再生の源であることが明らかにされた。さらに骨髄には、造血幹細胞とは別に、臓器や組織（例えば、骨、軟骨、筋肉、脂肪等）へ分化可能な幹細胞が包含されていることが報告されている（非特許文献1参照）。

10

【0004】

さらに、近年、骨髄以外にも、皮膚、肝臓、脾臓、脂肪等、あらゆる臓器や組織に幹細胞が存在することが明らかにされ、各臓器や組織の再生及び恒常性維持を司っていることがわかってきた（非特許文献2～5参照）。また、各臓器や組織に存在する幹細胞は可塑性に優れており、今まで自己複製が不可能であった臓器や組織の再生にも利用できる可能性がある。

【0005】

一方で、これらの幹細胞のうちのいくつかは、加齢とともに減少することが知られており、各組織の恒常性維持のために幹細胞の減少を防ぐ技術の研究が積極的になされている（非特許文献6）。また、近年、幹細胞の能力（多能性）を、臓器や組織の再生へ応用するため、細胞移植治療や組織工学（再生医療や再生美容）の分野において幹細胞を生体組織から分離した後に培養し増殖させる技術の開発が進められている（非特許文献7、8）。

20

【0006】

特に、幹細胞を生体外で培養する場合、幹細胞の能力である多能性を維持した状態、すなわち、未分化な状態を維持させたまま増殖させることが極めて重要である。もし、この培養時に幹細胞の未分化状態が維持できず分化誘導が進んでしまった場合、最終的に調製された幹細胞の能力（多能性）は失われていることになり、目的の効果（臓器や組織の再生等）を発揮できない。

30

【0007】

以上より、幹細胞を細胞移植治療や組織工学（再生医療や再生美容）に利用し、臓器や組織の再生を望む場合、幹細胞を、未分化状態を維持させたまま培養できなければならない。

【0008】

現在までに、幹細胞を、未分化状態を維持させたまま増殖させる技術について、幾つか報告があるが、未だ発展途上である。例えば、胚性幹細胞（ES細胞）や造血幹細胞は、支持細胞（ストローマ細胞、又はフィーダー細胞）と共培養することで未分化を維持することができる（特許文献1及び非特許文献9～11参照）。しかしながら、最近になってフィーダー細胞由来の内在性ウイルスによる異種動物間の感染例が報告されており（非特許文献12参照）、支持細胞を使用した幹細胞の培養は、医療用途を目的とした幹細胞の培養には適していない。

40

【0009】

その他の方法に、サイトカインを複雑に組合せることによって幹細胞の未分化状態を維持させる方法がある。例えば、マウスES細胞は、LIF（白血病抑制因子（Leukemia Inhibitory Factor））を培地に添加することによって、未分化性が維持される（特許文献2及び非特許文献13参照）。その他、初期作用性サイトカイントロンボポイエチン（TPO）、インターロイキン6（IL-6）、FLT-3リガンド、及び幹細胞因子（SCF）の存在下で、未分化性を維持させることが胚性幹細胞、体性幹細胞等で報告されている（特許文献3及び非特許文献14参照）。

50

【0010】

しかしながら、サイトカインは、高価であり、採取原料や保存性等の問題があり、容易な使用は難しい。加えて、LIFの効果は極めて特定の細胞系統に限定的であり、特に霊長類のES細胞や体性幹細胞においては、LIFの添加のみでは未分化状態を維持することができないことが明らかにされている（非特許文献10参照）。

【0011】

このように、現在、報告されている幹細胞の未分化状態の維持方法はいずれも、煩雑な操作を必要とし、また未分化状態の維持効果が低い。従って、幹細胞を再生医療に利用するために、幹細胞を、未分化状態を維持したまま増殖させる技術が求められていた。つまり、安全且つ簡便で効率的に、幹細胞を、未分化状態を維持させたまま増殖させることができる技術が求められていた。

10

【0012】

マコンブ（真昆布、学名：Saccharina japonica）は、コンブ目コンブ科カラフトコンブ属（コンブ属）に属する藻類で、国内では古くから食用とされており、つくだ煮や昆布巻などの加工品のほか、うま味のもとであるグルタミン酸が豊富に含まれていることからだし昆布として広く流通している。真昆布（マコンブ）はまた、葉茎部を乾燥したものが生薬として用いられており、消化管粘膜保護作用等を有することから、主に胃腸の働きを高めるための漢方薬に配合されている。これまでマコンブには、血管新生抑制作用（特許文献4）、インボルクリン産生促進に基づく皮膚バリア機能改善作用（特許文献5）、アルドース還元酵素阻害に基づく糖尿病合併症の予防・治療効果（特許文献6）などが知られている。しかしながら、マコンブの幹細胞の増殖促進効果や未分化状態維持効果については、これまで何ら知られていない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【文献】特開2004-24089号公報

特表2002-525042号公報

特許第3573354号公報

特開2006-22033号公報

特開2009-84195号公報

特開2008-214245号公報

30

【非特許文献】

【0014】

【文献】Pittenger M. F. ら, Science, 1999年, Vol. 284, pp. 143-147

Goodell M. A. ら, Nat. Med., 1997年, Vol. 3, pp. 1337-1345

Zulewski H. ら, Diabetes, 2001年, Vol. 50, pp. 521-533

Suzuki A. ら, Hepatology, 2000年, Vol. 32, pp. 1230-1239

40

Zuk P. A. ら, Tissue Engineering, 2001年, Vol. 7, pp. 211-228

長谷川靖司, Aesthetic Dermatology, 2013年, Vol. 23, pp. 1-11

馬淵 洋 他, 日本再生医療学会誌, 2007年, Vol. 6, pp. 263-268

北川 全 他, 日本再生医療学会誌, 2008年, Vol. 7, pp. 14-18

Thomson J. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995年, Vol. 92, pp. 7844-7848

Thomson J. A. ら, Science, 1998年, Vol. 282, pp. 1

50

145-1147

Reubinfoff B. E. ら, Nature Biotech., 2000年, Vol. 18, pp. 399-404

van der Laan L. J. ら, Nature, 2000年, Vol. 407, pp. 90-94

Smith A. G. ら, Dev. Biol., 1987年, Vol. 121, pp. 1-9

Madlambayan G. J. ら, J. Hematother. Stem Cell Res., 2001年, Vol. 10, pp. 481-492

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は、上述した実情に鑑み、幹細胞を、未分化状態を維持させたまま、効率良く増殖させることができる新たな物質を見出し、幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤として提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、マコンブの抽出物が、これまで知られていなかった幹細胞に対する優れた未分化状態維持効果及び増殖促進効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0017】

すなわち、本発明は、以下を包含する。

(1) マコンブの抽出物を有効成分として含有する幹細胞の未分化状態維持剤。

(2) マコンブの抽出物を有効成分として含有する幹細胞の増殖促進剤。

(3) 前記幹細胞が毛包幹細胞である、(1)又は(2)に記載の剤。

(4) 幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、幹細胞の製造方法。

(5) 幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、幹細胞の未分化状態維持方法。

(6) 幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、幹細胞の増殖促進方法。

(7) 前記幹細胞が毛包幹細胞である、(4)～(6)のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、幹細胞を、未分化状態を維持したまま、効率的に増殖させることができる。従って、本発明は、再生医療や再生美容の分野において大きく貢献できるものである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、マコンブの抽出物を有効成分として含有する。

【0020】

本発明に用いるマコンブ (*Saccharina japonica*、シノニムとして *Laminaria japonica*) は、コンブ目コンブ科カラフトコンブ属 (コンブ属) の海藻で、主に北海道南部や津軽海峡、岩手県北部に分布している。マコンブは、水深20mよりも浅瀬の岩に強固な根で定着して生育し、成長した葉は笹の葉状で、長さは1.5～6mほど、幅は20～35cmになり、縁辺部は薄く大きく波打っている。マコンブは、食用コンブとして最も上質とされており、主にだし取りに利用される。

【0021】

マコンブの入手先は、特に限定されないが、上記の生育地域から入手することができる

10

20

30

40

50

。本発明において、マコンブの抽出原料としては、海藻全体（全藻）を使用することが好ましいが、その一部、例えば、葉部（葉体・成葉）、莖部（中芯・中肋）、孢子葉部、根部等であってもよい。また、抽出には、海藻本体をそのまま使用してもよく、乾燥、粉碎、細切等の処理を行ってもよい。

【0022】

抽出方法は、特に限定されないが、水もしくは熱水、又は水と有機溶媒の混合溶媒を用い、攪拌又はカラム抽出する方法等により行うことができる。抽出溶媒としては、例えば、水、低級アルコール類（メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール等）、液状多価アルコール類（1, 3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン等）、ケトン類（アセトン、メチルエチルケトン等）、アセトニトリル、エステル類（酢酸エチル、酢酸ブチル等）、炭化水素類（ヘキサン、ヘプタン、流動パラフィン等）、エーテル類（エチルエーテル、テトラヒドロフラン、プロピルエーテル等）等が挙げられる。これらの溶媒のなかでも、水、低級アルコール及び液状多価アルコール等の極性溶媒が好ましく、水、エタノール、1, 3-ブチレングリコール及びプロピレングリコールがより好ましい。これらの溶媒は一種でも二種以上を混合して用いても良い。特に好ましい抽出溶媒としては、水、又は水-エタノール系の混合極性溶媒が挙げられる。また、上記抽出溶媒に酸やアルカリを添加して、pH調整した溶媒を使用することもできる。

【0023】

溶媒の使用量については、特に限定はなく、例えば上記海藻（乾燥重量）に対し、10倍以上、好ましくは20倍以上であればよいが、抽出後に濃縮を行ったり、単離したりする場合の操作の便宜上100倍以下であることが好ましい。また、抽出温度や時間は、用いる溶媒の種類や抽出時の圧力等によって適宜選択できる。例えば、10～100℃、好ましくは30～90℃で、30分～24時間、好ましくは1時間～10時間を例示することができる。

【0024】

上記抽出物は、抽出した溶液のまま用いてもよいが、必要に応じて、本発明の効果を奏する範囲で、濃縮（減圧濃縮、膜濃縮等による濃縮）、希釈、濾過、活性炭等による脱色、脱臭、エタノール沈殿等の処理を行ってから用いてもよい。さらには、抽出した溶液を濃縮乾固、噴霧乾燥、凍結乾燥等の処理を行い、乾燥物として用いてもよい

【0025】

このようにして得られたマコンブの抽出物は、生体レベルで又は培養レベルで未分化状態を維持させつつ幹細胞を効率的に増殖させる作用を有するので、幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤として使用できる。さらに、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、幹細胞を、未分化状態を維持しつつ効率的に増殖させるための幹細胞培養用培地添加剤、研究用試薬としても使用することができる。

【0026】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤を、ヒトを含めた哺乳動物の幹細胞に適用することで、幹細胞の未分化状態を維持し、また幹細胞の増殖を促進することができる。本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤を適用する幹細胞としては、本発明の目的に沿うものであれば特に限定されず、例えば胚性の幹細胞（ES細胞）；骨髓、血液、皮膚（表皮、真皮、皮下組織）、脂肪、毛包、脳、神経、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉やその他の組織に存在する体性の幹細胞；遺伝子導入等により人工的に作製された幹細胞（人工多能性幹細胞：iPS細胞）が挙げられる。本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、好ましくは、毛包幹細胞に対してより効果を発揮し、毛包内バルジ領域の毛包幹細胞の未分化状態を維持し、分化を抑制しながら、増殖を促進させることができる。ES細胞としては、例えば、着床以前の初期胚を培養することによって樹立されたES細胞、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立されたES細胞、及びそれらのES細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変したES細胞が挙げられる。このようなES細胞は、例えば、自

10

20

30

40

50

体公知の方法によって作製することができるが、所定の機関より入手でき、さらには市販品を購入することもできる。また、これらの幹細胞は、初代培養細胞、継代培養細胞又は凍結細胞のいずれであってもよい。

【0027】

さらに、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、幹細胞の分化の方向性及び分化の過程等について同等の特性を持っていれば、全ての哺乳動物由来の幹細胞に応用が可能である。例えば、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、ヒト、サル、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等の哺乳動物の幹細胞に対して効果を発揮することができる。

【0028】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤の幹細胞への適用は、生体外であっても生体内であってもよく、いずれの場合もその作用を発揮できる。従って、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、その有効量を添加した幹細胞培養用培地にて幹細胞を培養することによって、あるいは、ヒトを含む哺乳動物に投与することによって、幹細胞の未分化状態を維持し、増殖を促進することができる。

【0029】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、有効成分であるマコンブの抽出物が優れた幹細胞の未分化状態維持作用及び増殖促進作用を有するので、皮膚、骨芽、軟骨、筋肉、神経、脂肪、肝臓などの生体内の組織又は臓器の幹細胞に作用して当該組織又は臓器の障害又は損傷を治療、改善、及び予防するのに有効である。また、幹細胞は、加齢などに伴い減少又は機能低下することから、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、上記生体内の組織又は臓器の幹細胞の減少や機能低下に関連する疾患を治療、改善、及び予防するのに有効である。ここで、組織又は臓器の障害又は損傷、幹細胞の減少や機能低下に関連する疾患としては、例えば、皮膚関連では、シワ、タルミ、シミ、くすみ、肌荒れ、皮膚の肥厚、毛穴のひらき、ニキビ痕、創傷、瘢痕、ケロイドなどが挙げられ、薄毛や脱毛などの頭皮や毛髪の損傷も含まれる。また、骨関連では、骨粗しょう症、骨折（脊椎圧迫骨折、大腿骨頸部骨折等）など、軟骨疾患では、変形性関節症、関節リウマチ、椎間板ヘルニアなど、神経関連では、脊髄損傷、顔面神経麻痺、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、加齢に伴う記憶低下など、血液関連では、再生不良性貧血、白血病など、心血管関連では心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症など、歯科関連では歯周病、歯槽膿漏による歯槽骨損傷など、眼科関連では、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症、緑内障など、肝臓・膵臓関連では肝炎、肝硬変、糖尿病などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

また、マコンブの抽出物は、毛包幹細胞の増殖促進作用及び未分化状態維持作用を有する。すなわち、マコンブの抽出物は、毛包内バルジ領域の毛包幹細胞の分化抑制により、毛髪の元になる毛包幹細胞の減少又は枯渇を阻止できるとともに、毛包幹細胞の増殖を促進することができるので、脱毛症の予防及び／又は改善剤の有効成分とすることができる。本発明において、「脱毛症の予防及び／又は改善」には、脱毛や薄毛の発生の阻止、脱毛や薄毛の程度（本数や範囲）の改善、脱毛や薄毛の進行速度の低下、脱毛や薄毛に伴う毛髪の光沢や弾性の減少の抑制などが含まれる。また、脱毛症の予防及び／又は改善効果は、頭髮に直接な作用機序を示す場合と頭部における経皮的な作用機序を示す場合の両方を含む。本発明において、脱毛症とは、例えば、加齢、疾患、紫外線や過労などの種々のストレスなどにより、毛髪の一部又は全部が抜けて、頭皮の一部又は全体が透けて見える症状をいう。脱毛症には、例えば、男性型脱毛症（AGA）、びまん性脱毛症（FAGA）、円形脱毛症、老人性脱毛症、脂漏性脱毛症、粧糠性脱毛症、産後（分娩後）脱毛症、機械性（圧迫性若しくは牽引性）脱毛症、先天性脱毛症、火傷又は外傷後の脱毛症、抗がん剤による薬剤性脱毛症、瘢痕性脱毛症（毛孔性扁平苔癬、紅斑性狼瘡、禿髪性毛包炎、頭部乳頭状皮膚炎等）、トリコチロマニア（抜毛症）などが含まれるが、これらに限定はされない。

10

20

30

40

50

【0031】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤におけるマコンブの抽出物の含有量は、特に限定されないが、抽出物の性状（抽出液、濃縮物、又は乾燥物）により、例えば、0.00001～100重量%の範囲で適宜設定でき、0.0001～10重量%が好ましく、0.001～1重量%であることがより好ましい。

【0032】

本発明はまた、幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養することで、幹細胞の未分化状態を維持させたまま、幹細胞増殖を促進する方法に関する。換言すれば、本発明に係る方法は、幹細胞を、マコンブの抽出物を含有する培地で培養する工程を含む、幹細胞の製造方法、幹細胞の未分化状態維持方法、又は幹細胞の増殖促進方法ということが10

【0033】

本発明に係る方法において、幹細胞の培養には、幹細胞の未分化状態維持及び増殖のために一般的に使用されている培地を用いればよい。例えば、幹細胞の生存及び増殖に必要な成分（無機塩、炭水化物、ホルモン、必須アミノ酸、非必須アミノ酸、ビタミン、脂肪酸）を含む基本培地、具体的には、Dulbecco's Modified Eagle Medium(D-MEM)、Minimum Essential Medium(MEM)、RPMI1640、Basal Medium Eagle(BME)、Ham's F12、Ham's F12K(Kaighn's modified of Ham's F12)、Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12(D-MEM/F-12)、Glasgow inimum Essential Medium(Glasgow MEM)、ハンクス液(Hank's balanced salt solution)、MCD B15320 培地等が挙げられる。また、培地に、増殖因子[上皮細胞増殖因子(EGF)、コレラトキシン、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、白血球遊走阻止因子(LIF)、Stem Cell Factor(SCF)等]、ホルモン（インスリン、ヒドロコルチゾン等）を添加することが好ましい。さらに、必要に応じて、培地は、腫瘍壊死因子(TNF)、ビタミン類、インターロイキン類、トランスフェリン、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コラーゲン、フィブロネクチン、プロゲステロン、セレナイト、B27-サプリメント、N2-サプリメント、ITS-サプリメント、抗生物質等を含むてもよい。

【0034】

また、上記の成分以外には、0.1～20% (v/v) の含有率でウシ脳下垂体抽出物(BPE)、血清又は血清代替物が培地に含まれることが好ましい。血清又は血清代替物は、公知のものであればいずれのものも用いることができる。例えば、血清としては、ウシ胎児血清(FBS、FCS)などが挙げられ、血清代替物としては、KSRなどが挙げられる。しかしながら、血清はロットの違いにより成分が異なり、その効果にバラツキがあるため、ロットチェックを行った後に使用することが好ましい。30

【0035】

市販品の培地としては、インビトロジェン製の間葉系幹細胞基礎培地や、三光純薬製の間葉系幹細胞基礎培地、TOYOB O社製のMF培地、Sigma社製のハンクス液(Hank's balanced salt solution)等を用いることができる。また、幹細胞が毛包幹細胞である場合は、上皮系細胞の培養に必要な成分（例えば、インスリン、ヒドロコルチゾン、上皮細胞増殖因子等）を含む市販の上皮系細胞用培地を用いればよく、例えば、Keratinocyte-SF M培地(Thermo Fisher Scientific社製)、Humedia-KG2培地(KURABO社)、CnT-PR培地(CellnTec社)、MCD B153培地(Sigma社製)、正常ヒトケラチノサイト用無血清培地(DSファーマバイオメディカル社製)等が挙げられる。40

【0036】

幹細胞の培養に用いる培養器は、幹細胞の培養が可能なものであれば特に限定されないが、例えば、フラスコ、シャーレ、ディッシュ、プレート、チャンバースライド、チューブ、トレイ、培養バッグ、ローラーボトルなどが挙げられる。

【0037】

培養器は、細胞非接着性であっても接着性であってもよく、目的に応じて適宜選択される。細胞接着性の培養器は、細胞との接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス等50

による細胞支持用基質などで処理したものを用いてもよい。細胞支持用基質としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチンなどが挙げられる。

【0038】

幹細胞培養に使用される培地に対するマコンブの抽出物の添加濃度は、上述の本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤におけるマコンブの抽出物の含有量に準じて適宜決定することができるが、マコンブの乾燥物に換算して、例えば10～10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは100～5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度が挙げられる。また、幹細胞の培養期間中、これらの抽出物を定期的に培地に添加してもよい。

【0039】

幹細胞の培養条件は、幹細胞の培養に用いられる通常の条件に従えばよく、特別な制御は必要ではない。例えば、培養温度は、特に限定されるものではないが約30～40℃、好ましくは36～37℃である。CO₂ガス濃度は、例えば約1～10%、好ましくは約2～5%である。なお、培地の交換は2～3日に1回行うことが好ましく、毎日行うことがより好ましい。前記培養条件は、幹細胞が生存及び増殖可能な範囲で適宜変動させて設定することもできる。

【0040】

幹細胞の未分化状態維持は、例えば、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤の非存在下で培養した幹細胞と比較して、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤の存在下で培養した該幹細胞において幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現レベルがmRNAレベル又はタンパク質レベルで培養開始時の発現レベルと同程度のレベルに有意に維持されているか否かで評価することができる。幹細胞未分化マーカー遺伝子としては、例えばNanog遺伝子(Cell Res. 2007 Jan; 17(1): 42-9. Review. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. Pan G, Thomson JA.)等が挙げられる。また、毛包幹細胞未分化マーカー遺伝子としては、例えばKRT15(Keratin, type I cytoskeletal 15)等が挙げられる。

【0041】

幹細胞未分化マーカー遺伝子発現レベルの測定方法としては、mRNAレベルでは、例えば幹細胞未分化マーカー遺伝子に特異的なプライマーやプローブを用いたRT-PCR、定量PCRやノーザンブロットティング等の方法が挙げられ、また、タンパク質レベルでは、例えば幹細胞未分化マーカー遺伝子によりコードされるタンパク質に特異的な抗体を用いたELISA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロットティング等の免疫学的方法が挙げられる。

【0042】

発現レベルの測定の結果、培養開始時(100%未分化状態)の幹細胞における幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現レベルと本発明の幹細胞の未分化状態維持剤の存在下で所定時間培養後の幹細胞における幹細胞未分化マーカー遺伝子の発現レベルとの相対比が、本発明の幹細胞の未分化状態維持剤の非存在下で培養した場合の同相対比(コントロール)よりも大きい場合に幹細胞の未分化状態を維持できたと判定することができる。

【0043】

また、幹細胞の増殖促進は、例えば、本発明に係る幹細胞の増殖促進剤の非存在下で培養した幹細胞と比較して、本発明に係る幹細胞の増殖促進剤の存在下で培養した該幹細胞の細胞数が有意に増加されているか否かで評価することができる。細胞数の測定は、例えば、MTT法やWST法などにより、市販の細胞数測定キットを用いて行うことができる。測定の結果、培養開始時の幹細胞の細胞数と本発明の幹細胞の増殖促進剤の存在下で所定時間培養後の幹細胞の細胞数との相対比が、本発明の幹細胞の増殖促進剤の非存在下で培養した場合の同相対比(コントロール)よりも大きい場合に幹細胞の増殖を促進できたと判定することができる。

10

20

30

40

50

【0044】

上記の本発明に係る方法により調製された幹細胞は移植材料（細胞移植剤）として用いることができ、従来の骨髄移植又は臍帯血移植と同一の方法で実施できる。

【0045】

上記の本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤あるいは本発明に係る方法に準じて、マコンブの抽出物を、単独で、あるいは培地と別々に又は培地と混合し、幹細胞の未分化状態維持又は増殖促進のための試薬キットとして提供することもできる。当該キットは、必要に応じて取扱い説明書等を含むことができる。あるいは、マコンブの抽出物を培地と混合し、幹細胞の未分化状態維持又は増殖促進用培地として提供することもできる。

10

【0046】

本発明に係る上記の幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤を生体内に投与する場合は、そのまま投与することも可能であるが、本発明の効果を損なわない範囲で適当な添加物とともに化粧品、医薬部外品、医薬品、飲食品等の各種組成物に配合して提供することができる。なお、本発明の医薬品には、動物に用いる薬剤、即ち獣医薬も包含されるものとする。

【0047】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤を化粧品や医薬部外品に配合する場合は、その剤形は、水溶液系、可溶化系、乳化系、粉末系、粉末分散系、油液系、ゲル系、軟膏系、エアゾール系、水-油二層系、又は水-油-粉末三層系等のいずれでもよい。また、当該化粧品や医薬部外品は、幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤とともに、皮膚外用組成物において通常使用されている各種成分、添加剤、基剤等をその種類に応じて選択し、適宜配合し、当分野で公知の手法に従って製造することができる。その形態は、液状、乳液状、クリーム状、ゲル状、ペースト状、スプレー状等のいずれであってもよい。皮膚外用組成物の配合成分としては、例えば、油脂類（オリーブ油、ヤシ油、月見草油、ホホバ油、ヒマシ油、硬化ヒマシ油等）、ロウ類（ラノリン、ミツロウ、カルナウバロウ等）、炭化水素類（流動パラフィン、スクワレン、スクワラン、ワセリン等）、脂肪酸類（ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘニン酸等）、高級アルコール類（ミリスチルアルコール、セタノール、セトステアリルアルコール、ステアリルアルコール、ベヘニルアルコール等）、エステル類（ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、オクタン酸セチル、トリオクタン酸グリセリン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ステアリン酸オクチル、ステアリン酸ステアリル等）、有機酸類（クエン酸、乳酸、 α -ヒドロキシ酢酸、ピロリドンカルボン酸等）、糖類（マルチトール、ソルビトール、キシロピオース、N-アセチル-D-グルコサミン等）、蛋白質及び蛋白質の加水分解物、アミノ酸類及びその塩、ビタミン類、植物・動物抽出成分、種々の界面活性剤、保湿剤、紫外線吸収剤、抗酸化剤、安定化剤、防腐剤、殺菌剤、香料等が挙げられる。

20

30

【0048】

化粧品や医薬部外品の種類としては、例えば、化粧水、乳液、ジェル、美容液、一般クリーム、日焼け止めクリーム、パック、マスク、洗顔料、化粧石鹸、ファンデーション、おしろい、浴用剤、ボディローション、ボディシャンプー、ヘアシャンプー、ヘアコンディショナー、育毛剤等が挙げられる。

40

【0049】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤を医薬品に配合する場合は、薬理的及び製剤学的に許容しうる添加物と混合し、患部に適用するのに適した製剤形態の各種製剤に製剤化することができる。薬理的及び製剤学的に許容しうる添加物としては、その剤形、用途に応じて、適宜選択した製剤用基材や担体、賦形剤、希釈剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、安定化剤、保存剤、防腐剤、増量剤、分散剤、湿潤化剤、緩衝剤、溶解剤又は溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、噴射剤、着色剤、甘味剤、矯味剤、香料等を適宜添加し、公知の種々の方法にて経口又は非経口的に

50

全身又は局所投与することができる各種製剤形態に調製すればよい。本発明の医薬品を上記の各形態で提供する場合、通常当業者に用いられる製法、たとえば日本薬局方の製剤総則〔2〕製剤各条に示された製法等により製造することができる。

【0050】

本発明の医薬品の形態としては、特に制限されるものではないが、例えば錠剤、糖衣錠剤、カプセル剤、トローチ剤、顆粒剤、散剤、液剤、丸剤、乳剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤などの経口剤、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）、点滴剤、座剤、軟膏剤、ローション剤、点眼剤、噴霧剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、貼付剤などの非経口剤などが挙げられる。また、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよく、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供される。

10

【0051】

本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤を、前記皮膚関連の損傷や疾患を治療、改善、及び予防するための医薬品として用いる場合に適した形態は外用製剤であり、例えば、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、液剤、貼付剤（パップ剤、プラスター剤）、フォーム剤、スプレー剤、噴霧剤などが挙げられる。軟膏剤は、均質な半固形状の外用製剤をいい、油脂性軟膏、乳剤性軟膏、水溶性軟膏を含む。ゲル剤は、水不溶性成分の抱水化合物を水性液に懸濁した外用製剤をいう。液剤は、液状の外用製剤をいい、ローション剤、懸濁剤、乳剤、リニメント剤等を含む。

【0052】

本発明の医薬品は、上記疾患の発症を抑制する予防薬として、及び／又は、正常な状態に改善する治療薬として機能する。本発明の医薬品の有効成分は、天然物由来であるため、非常に安全性が高く副作用がないため、前述の疾患の治療、改善、及び予防用医薬として用いる場合、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ等の哺乳動物に対して広い範囲の投与量で経口的に又は非経口的に投与することができる。

20

【0053】

本発明の化粧品、医薬品、医薬部外品における幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤の含有量は特に限定されないが、製剤（組成物）全重量に対して、マコンブの抽出物の乾燥物に換算して、0.001～30重量%が好ましく、0.01～10重量%がより好ましい。上記の量があくまで例示であって、組成物の種類や形態、一般的な使用量、効能・効果などを考慮して適宜設定・調整すればよい。また、製剤化における有効成分の添加法については、予め加えておいても、製造途中で添加してもよく、作業性を考えて適宜選択すればよい。

30

【0054】

また、本発明に係る幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤は、飲食品にも配合できる。また、本発明において、飲食品とは、一般的な飲食品のほか、医薬品以外で健康の維持や増進を目的として摂取できる食品、例えば、健康食品、機能性食品、保健機能食品、又は特別用途食品を含む意味で用いられる。健康食品には、栄養補助食品、健康補助食品、サプリメント等の名称で提供される食品を含む。保健機能食品は食品衛生法又は健康増進法により定義され、特定の保健の効果や栄養成分の機能、疾病リスクの低減などを表示できる、特定保健用食品及び栄養機能食品、ならびに科学的根拠に基づいた機能性について消費者庁長官に届け出た内容を表示できる機能性表示食品が含まれる。また特別用途食品には、特定の対象者や特定の疾患を有する患者に適する旨を表示する病者用食品、高齢者用食品、乳児用食品、妊産婦用食品等が含まれる。幹細胞が毛包幹細胞である場合は、本剤は、抜け毛や薄毛を予防又は改善するための健康食品に好適に用いることができる。ここで、飲食品に付される特定の保健の効果や栄養成分の機能等の表示は、製品の容器、包装、説明書、添付文書などの表示物、製品のチラシやパンフレット、新聞や雑誌等の製品の広告などにすることができる。

40

【0055】

飲食品の形態は、食用に適した形態、例えば、固形状、液状、顆粒状、粒状、粉末状、

50

カプセル状、クリーム状、ペースト状のいずれであってもよい。特に、上記の健康食品等の場合の形状としては、例えば、タブレット状、丸状、カプセル状、粉末状、顆粒状、細粒状、トローチ状、液状（シロップ状、乳状、懸濁状を含む）等が好ましい。

【0056】

飲食品の種類としては、パン類、麺類、菓子類、乳製品、水産・畜産加工食品、油脂及び油脂加工食品、調味料、各種飲料（清涼飲料、炭酸飲料、美容ドリンク、栄養飲料、果実飲料、乳飲料など）及び該飲料の濃縮原液及び調整用粉末等が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0057】

本発明の飲食品は、その種類に応じて通常使用される添加物を適宜配合してもよい。添加物としては、食品衛生法上許容されうる添加物であればいずれも使用できるが、例えば、ブドウ糖、ショ糖、果糖、異性化液糖、アスパルテーム、ステビア等の甘味料；クエン酸、リンゴ酸、酒石酸等の酸味料；デキストリン、デンプン等の賦形剤；結合剤、希釈剤、香料、着色料、緩衝剤、増粘剤、ゲル化剤、安定剤、保存剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤などが挙げられる。

【0058】

本発明の飲食品が一般的な飲食品の場合は、その飲食品の通常の製造工程においてマコンブの抽出物を添加する工程を含めることによって製造することができる。また健康食品の場合は、前記の医薬品の製造方法に準じればよく、例えば、タブレット状のサプリメントでは、マコンブの抽出物に、賦形剤等の添加物を添加、混合し、打錠機等で圧力をかけて成形することにより製造することができる。また、必要に応じてその他の材料（例えば、ビタミンC、ビタミンB₂、ビタミンB₆等のビタミン類、カルシウムなどのミネラル類、食物繊維等）を添加することもできる。

【0059】

本発明の飲食品におけるマコンブの抽出物の配合量は、幹細胞の未分化状態維持効果及び増殖促進効果を発揮できる量であればよいが、対象飲食品の一般的な摂取量、飲食品の形態、効能・効果、呈味性、嗜好性及びコストなどを考慮して適宜設定すればよい。

【実施例】

【0060】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0061】

[実施例1] マコンブの抽出物の製造例

マコンブの抽出物を以下のとおり製造した。製造例1～4において抽出材料には海藻の全藻を用いた。

【0062】

（製造例1）マコンブの熱水抽出物の製造

マコンブの乾燥物10gに200mLの水を加え、95～100℃で2時間抽出した。得られた抽出液を濾過し、その濾液を濃縮し、凍結乾燥してマコンブの熱水抽出物を2.0g得た。

【0063】

（製造例2）マコンブの50%エタノール抽出物の製造

マコンブの乾燥物10gを200mLの50%エタノール水溶液に室温で7日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を濾過した後、エバポレーターで濃縮乾固してマコンブの50%エタノール抽出物を0.3g得た。

【0064】

（製造例3）マコンブのエタノール抽出物の製造

マコンブの乾燥物10gを200mLのエタノールに室温で7日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を濾過した後、エバポレーターで濃縮乾固してマコンブのエタノール抽出物を0.1g得た。

【0065】

(製造例4) マコンブの1, 3-ブチレングリコール抽出物の製造

マコンブの乾燥物10gを200mLの1, 3-ブチレングリコールに室温で7日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を濾過してマコンブの1, 3-ブチレングリコール抽出物を190g得た。

【0066】

【実施例2】 マコンブの抽出物の毛包幹細胞に対する増殖促進効果及び未分化状態維持効果

以下に、実施例1において製造したマコンブの抽出物を用いた、幹細胞に対する増殖促進効果及び未分化状態維持効果の実験例とその結果を示す。

【0067】

(実験例1) マコンブの抽出物の毛包幹細胞に対する増殖促進効果の評価

(1) ヒト毛包幹細胞の培養

ヒトの毛髪を毛抜きで採取し、メス等を用いて毛包組織のバルジ領域を含む組織を回収した。PBS(-)にて洗浄した後、トリプシン(BD Biosciences社製)処理を行った。その後、セルストレイナー(FALCON社製)を用いて、細胞を単離し、回収した。回収した細胞を培養プレートに播種し、KG2培地(KURABO社製)を用いてコンフルエントになるまで維持した。コンフルエントになった細胞を回収し、培養プレートに再び播種し、その後生着し、増殖している細胞を毛包幹細胞として以下の試験に用いた。

【0068】

(2) マコンブの抽出物の毛包幹細胞に対する増殖促進活性の評価

毛包幹細胞にマコンブの抽出物を作用させ、マコンブの抽出物が毛包幹細胞の増殖にどのように関わっているかを評価した。KG2培地(KURABO社製)にて培養した毛包幹細胞を24ウェルの培養プレートに 1×10^4 個ずつ播種し、被験物質(製造例1~4のマコンブの抽出物)を最終濃度が1000 μ g/mlとなるように添加し、3日間培養を行った。

【0069】

3日後の毛包幹細胞の細胞増殖率をMTTアッセイにより検出した。MTTアッセイは市販のMTTアッセイキット(コスモバイオ社製)を用い、添付されているプロトコルに従って行った。被験物質未添加時の総細胞数をコントロールとし、コントロールを100(%)とした場合の、被験物質添加時の細胞数の増減(%)を算出し、幹細胞増殖促進効果の評価を行った。これらの試験結果を以下の表1に示す。

【0070】

【表1】

各抽出物の毛包幹細胞に対する増殖促進効果の評価

添加抽出物	細胞増殖率(%)*
未添加(コントロール)	100
製造例1の抽出物	184
製造例2の抽出物	163
製造例3の抽出物	144
製造例4の抽出物	160

*培養3日後の未添加群(コントロール)における細胞数を100%として、各抽出物添加群の細胞増殖率(%)を示した。

【0071】

表1に示すように、マコンブの抽出物(製造例1~4)には、毛包幹細胞に対していずれも顕著な増殖促進効果が認められた。なお、本実験例で用いた幹細胞以外に、胚性の幹細胞(ES細胞)についても同様な試験を行ったところ、顕著な幹細胞増殖促進効果が認められた。

【0072】

(実験例2) マコンブの抽出物の毛包幹細胞に対する未分化状態維持効果の評価

毛包幹細胞にマコンブの抽出物を作用させ、マコンブの抽出物が毛包幹細胞の未分化性にどのように関わっているかを評価した。KG2培地(KURABO社製)にて培養した毛包幹細胞を24ウェルの培養プレートに 1×10^4 個ずつ播種し、被験物質(製造例1～4のマコンブの抽出物)を最終濃度が $1000 \mu\text{g/ml}$ となるように添加して培養し、マコンブの抽出物の添加3日後の毛包幹細胞を回収し、毛包幹細胞の未分化性をKRT15(Keratin, type I cytoskeletal 15)の遺伝子発現量を指標に解析した。

【0073】

KRT15の遺伝子発現解析は次の通り行った。マコンブの抽出物添加後の毛包幹細胞をPBS(-)にて2回洗浄した後、Trizol Reagent(Invitrogen社製)によって該細胞からRNAを抽出した。2-STEPリアルタイムPCRキット(Applied Biosystems社製)を用いて、抽出したRNAをcDNAに逆転写した後、ABI7300(Applied Biosystems社製)により、下記プライマーセットを用いてリアルタイムPCR($95^\circ\text{C}:15$ 秒間、 $60^\circ\text{C}:30$ 秒間、40cycles)を実施し、KRT15の遺伝子発現量を測定した。その他の操作は定められた方法に従って実施した。

【0074】

KRT15(毛包幹細胞未分化マーカー)用プライマーセット:

5'-GATGCTGCTTGACATAAAGACACG-3'(配列番号1)

5'-ACCTGTCCATCCACTGACTCTTC-3'(配列番号2)

18srRNA(内部標準)用プライマーセット:

5'-CCGAGCCGCCTGGATAC-3'(配列番号3)

5'-CAGTTCCGAAAACCAACAAATAGA-3'(配列番号4)

【0075】

毛包幹細胞の未分化状態維持効果は、培養開始時の毛包幹細胞におけるKRT15のmRNAの発現量を内部標準である18s ribosomal RNA(18srRNA)の発現量に対する割合として算出したKRT15遺伝子相対発現量($\text{KRT15遺伝子発現量}/\text{18srRNA遺伝子発現量}$)の値を100%未分化状態とし、これに対し、培養3日後の毛包幹細胞におけるKRT15の遺伝子相対発現量の値を算出し、評価した。これらの試験結果を以下の表2に示す。

【0076】

【表2】

各抽出物の毛包幹細胞に対する未分化状態維持効果の評価

添加抽出物	KRT15(未分化マーカー)*
未添加(コントロール)	47
製造例1の抽出物	96
製造例2の抽出物	81
製造例3の抽出物	76
製造例4の抽出物	80

* 培養開始時の毛包幹細胞が発現しているKRT15の遺伝子相対発現量を100%未分化状態として解析した。

【0077】

表2に示すように、マコンブの抽出物(製造例1～4)には、毛包幹細胞に対していずれも顕著な未分化状態維持効果が認められた。なお、本実験例で用いた幹細胞以外に、胚性の幹細胞(ES細胞)についても同様な試験を行ったところ、顕著な幹細胞未分化状態維持効果が認められた。

【0078】

以上の各実験例に示すように、マコンブの抽出物を幹細胞に適用することで、従来の技術に比べて、簡便且つ効率的に、未分化状態を維持させたまま幹細胞の増殖を促進させることが可能になった。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 9 】

本発明の活用例として、再生医療や再生美容への応用が期待される。例えば、本発明を利用することで、再生医療や再生美容に用いる未分化状態の幹細胞を簡便に効率良く調製することが可能となる。さらに、幹細胞の移植後又は組織に存在する幹細胞に対して、本発明に係るマコンブの抽出物を、直接的に注入するか又は経口投与、塗布、貼付等により適用することで、該幹細胞を、未分化状態を維持させたまま増殖させることが可能である。

すなわち、本発明は、再生医療や再生美容における、幹細胞の製造方法及び／又は幹細胞の未分化状態維持剤又は増殖促進剤としての利用が可能である。

【配列表】

0007202610000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 Q 7/00 (2006.01)

A 6 1 Q 7/00

A 2 3 L 33/10 (2016.01)

A 2 3 L 33/10

(72)発明者 坂井田 勉

愛知県名古屋市区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内

審査官 福山 則明

(56)参考文献

特開2013-252062 (JP, A)

韓国公開特許第10-2016-0137079 (KR, A)

特開2006-028118 (JP, A)

特表2017-518772 (JP, A)

特開2017-085923 (JP, A)

J Med Food, 2018年05月01日, Vol. 21, No. 5, pp. 496-505

Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., 1994年, No. 51, pp. 103-107

日本化粧品技術者会誌, 2004年, Vol. 38, No. 1, pp. 10-14

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 36/00-36/9068

A 6 1 K 31/00-31/80

A 6 1 K 8/00-8/99

C 1 2 N 5/074

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580/JSTChina (JDream
III)